

İSKEMİK KALP HASTALARINDA LAKTİK DEHİDROGENAZ(LDH) İZOENZİM DÜZEYLERİNİN POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ İLE ARAŞTIRILMASI

M.Emin ERDAL*, Nurten ERDAL**, Sibel OĞUZKAN***

Anahtar Terimler:İskemik kalp hastalığı, Laktik dehidrogenaz izoenzim, Poliakrilamid jel elektroforezi
Key Words:Ischemic heart diseases, Lactate dehydrogenase isoenzymes, Polyacrylamide gel electrophoresis.

ÖZET

Bu araştırmada 50 İskemik Kalp Hastası birey ile 50 sağlıklı bireyin spektrofotometrik yöntemle total LDH miktarları(ünite/litre), Poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi kullanılarak LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 ve LDH-5 izoenzim düzeyleri belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular Student's t testi ile değerlendirildiğinde Total LDH miktarının hasta grubunda anlamlı düzeyde ($P<0.05$) artmış olduğu gözlenmiştir. LDH izoenzim düzeyleri değerlendirildiğinde farklılıklar olmasına karşın istatistiksel düzeyde önemli olmadığı saptanmıştır($P>0.05$).

SUMMARY

Lactate Dehydrogenase Isoenzymes Levels in Patients with Ischemic Heart Diseases Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

In this study, total LDH level of 50 patients with Ischemic Heart Diseases and 50 Healthy person were measured using Spectrophotometric method. Also their LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 and LDH-5 isoenzyme levels were determined densitometrically after using PAGE.

Student's t Test were used and it was observed in patients with Ischemic Heart Diseases that their LDH levels were significantly increased, compared with the control group. Also their LDH isoenzyme levels were determined. Some differences were seen between healthy persons and patients with Ishhemic Heart Diseases. However, these changes were not statistically significant.

GİRİŞ

Piruvatın laktata çevrilmesini katalizleyen enzim olan laktat dehidrogenaz (LDH)'ın LDH-1,LDH-2, LDH-3, LDH-4 ve LDH-5 olarak isimlendirilen çeşitli izoenzimler vardır(1,2,3,4). LDH izoenzimlerin sentezi, insanda 11 ve 12

* Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD., Yrd.Doç.Dr.

** Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ABD., Yrd.Doç.Dr.

*** Biyolog

Bu araştırma Gaziantep Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Ayrıca, III.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresinde Poster Bildiri olarak sunulmuştur(29 Ekim 1994-1 Kasım 1994 ANTALYA).

numaralı kromozomlardaki genler tarafından kontrol edilmektedir(5,6). Herbir izoenzim M ve H subünitlerinin oluşturduğu dört polipeptit zincirinden oluşmuştur(7). Bu M ve H subünitlerin farklı şekilde bir araya gelmeleri LDH izoenzimlerinin yapısını oluşturmaktadır. Buna göre; LDH-1(HHHH), LDH-2(HHHM), LDH-3(HHMM), LDH-4(HMMM) ve LDH-5(MMMM) şeklinde bir araya gelmektedir(1,3,4,8). Herbir izoenzimin hücrede, dokuda ve vücut sıvılarında bulunuş oranları, o bireyin sağlık durumunun öğrenilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle; hangi nedenle olursa olsun, vücudun çeşitli dokularındaki hücrelerin belirli sürelerde oksijensiz kalması durumunda, izoenzimlerin sentezinde değişimler meydana gelmekte ve sonuçta oranları değişmektedir. Bu oranların bilinmesi insan sağlığı yönünden, birçok hastalığın tanısının konulmasında ve dolayısıyla klinik kullanım açısından çok önemlidir(3,4,8).

Bu araştırmada hasta potansiyelinin çok ve LDH izoenzim düzeylerinin de önemli olması açısından iskemik kalp hastaları seçilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gaziantep Sosyal Sigortalar Kurumu Hastanesi Dahiliye Kliniğinde ve Gaziantep Devlet Hastanesi Kalp ve Koroner Yoğun Bakım Servisinde yatarak tedavi gören ve klinik olarak iskemik kalp hastalığı tanısı konmuş 24 erkek, 26 kadın toplam 50 hasta bireyden; kontrol grubu olarak sağlıklı 22 erkek, 28 kadın toplam 50 bireyden 10 ml kan örneği alınmıştır. Kan örnekleri laboratuvarında 2000 g'de 15 dak. santrifüj edilmiş(Hermlle Z-320 ile) ve serumları ayrılarak analizleri yapıncaya kadar buzdolabında saklanmıştır.

Hasta ve kontrol gruplarına ait serumların total LDH değerleri Cromatest LDH kiti (Cromatest E 540) kullanılarak 30°C'de 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak saptanmıştır(Pharmacia, LKB Ultrospec II, UV/VIS kullanılarak).

Serum örneklerine ayrıca LDH izoenzimlerinin ayrıştırılması için poliakrilamid jel elektroforezi uygulanmıştır(9). Bu amaçla yapılan işlemler şunlardır:

1) % 7.5'lik akrilamid jel solüsyonu hazırlanmıştır [DIETZ,A.A and LUBRANO, T. yöntemiyle(9)]. Bu solüsyondan 11 ml alınarak 4 ml distile suyla karıştırılarak % 5.5'luk jel solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon 12 adet jel tüpü için yeterli miktardır(jel tüpleri 63 mm boy x 7 mm iç çap).

2) Jel solüsyonu jel tüpünün 42 mm'lik bölümüne kadar doldurulmuş ve üzeri su ile kapatılarak, ışık karşısında(UV/VIS double ışık kaynağı ile) polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Üst kısımdaki su tabakası alınarak atılır.

3) Serum örnekleri 1:1 oranında % 40'lık sucroz solüsyonuyla seyreltilir.

Bu şekilde hazırlanmış örneklerden 10 µl jel üzerine bırakılır. Bunun üzerine

% 40'lık sucros solüsyonundan 30 μ l ve 10 μ l Bromphenol blue (% 0.1) boyası bırakılır. En üstte elektroforez tamponundan doldurulur(1 lt'de 6 gr Tris, 28.8gr Glycine).

4) Üzerine örnek uygulanmış jel tüpleri elektroforez işlemi için cihaza yerleştirilir(Hoefler scientific). Alt ve üst bölümler elektroforez tamponuyla doldurulur. Her jel tüpü için 2.5 mA akım uygulanır. İndikatör boya(Bromphenol Blue) jelin alt ucuna geldiğinde akım kesilir.

5) Elektroforez işleminden sonra jeller jel tüplerinden çıkarılır ve içerisinde boya solüsyonu bulunan 75 mm x 10 mm'lik kültür tüpüne konur. Boyama işlemi 37°C'de yaklaşık 2 saatte gerçekleşir(10,11).

6) Jel içerisinde LDH izoenzimlerinin yerleşim şekli orijinden başlayarak(yani en yavaş ilerleyenden) LDH-5, LDH-4, LDH-3, LDH-2 ve en hızlı yürüyen LDH-1 olarak jel içerisinde kalitatif olarak gözlenebilir(4,8). Jeller kantitatif değerlendirmeleri yapılıncaya kadar % 7'lik asetik asit içerisinde buzdolabında saklandı(12).

Kullanılan Boya Solüsyonu(9,11):

<u>STOK</u>	<u>KULLANILAN MİKTAR</u>
Lithium Lactate, M.....	20 ml
NAD, 10 mg/ml.....	20 ml
NaCl, 0.1 M	20 ml
MgCl ₂ , 5 mM	20 ml
Phosphate Buffer, 0.5 M	45 ml
Nitroblue tetrazolium, 1 mg/ml	45 ml
Phenazine methosulfate, 1 mg/ml	5 ml

Stok solüsyonlar 5°C'de saklandığında uzun süre saklanabilir. NAD ise haftalık hazırlanır.

Boyanmış jellerdeki LDH izoenzimlerinin kantitatif değerlendirmeleri, Densitometre(Beckman Appraise) kullanılarak 600 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir(13).

Elde edilen sonuçlar iki ortalama arasındaki farkın önemlilik düzeyini ölçen Student's t testi ile değerlendirilmiştir(14).

BULGULAR

Elde edilen bulgular Tablo 1,2 ve 3'de verilmiştir.

Tablo 1:Hasta Grubunu Oluşturan Bireylerin Total LDH Miktarları (Ünite/Litre) LDH İzoenzimleri ve LDH-1/LDH-2 oranlarına ait Bulgular.

Tablo 1.Hasta grubunu oluşturan bireylerin total LDH miktarlarına (Ünite/litre) LDH izoenzimleri ve LDH-1/LDH-2 oranlarına ait bulgular.

No	Total	LDH-1 %	LDH-2 %	LDH-3 %	LDH-4 %	LDH-5 %	LD1/LD2
1	241	48.1	25.4	15.6	5.7	5.1	1.89
2	393	61.4	21.9	9.5	5.3	1.9	2.80
3	327	56.2	25.6	9.7	5.5	3.1	2.20
4	150	55.0	30.8	9.7	2.0	2.5	1.79
5	344	51.8	31.1	13.0	2.8	1.3	1.67
6	324	56.0	24.8	15.2	2.3	1.7	2.26
7	206	57.6	31.6	6.6	3.2	1.0	1.82
8	169	49.9	23.1	17.3	5.8	3.8	2.16
9	108	69.1	19.5	7.7	1.9	1.7	3.54
10	191	49.7	36.8	9.9	1.3	2.2	1.35
11	351	59.8	24.2	8.8	3.7	3.5	2.47
12	186	45.5	33.4	14.4	4.2	2.5	1.36
13	132	39.3	32.8	21.1	3.2	3.6	1.20
14	339	58.1	25.6	10.4	4.2	1.6	2.27
15	127	47.0	32.5	13.7	4.4	2.3	1.45
16	344	40.3	44.7	11.6	2.2	1.2	0.90
17	243	60.1	30.5	6.7	1.7	1.1	1.97
18	324	54.1	35.1	7.5	1.7	1.4	1.54
19	629	52.5	34.3	8.3	2.2	2.7	1.53
20	267	62.4	33.5	2.2	1.0	0.9	1.86
21	342	41.6	30.4	17.1	8.4	2.5	1.37
22	314	40.3	29.6	17.7	10.0	2.3	1.36
23	194	44.6	19.2	30.6	4.9	0.7	2.32
24	388	56.9	26.4	10.6	3.2	3.0	2.16
25	300	32.7	46.9	8.5	7.5	4.4	0.70

Tablo.1. devamı

26	393	48.8	35.5	5.9	7.0	2.9	1.37
27	327	44.0	30.7	16.0	4.5	4.8	1.43
28	241	52.7	27.1	14.8	3.5	1.9	1.94
29	267	31.2	29.6	16.5	11.6	11.0	1.05
30	324	12.8	36.2	19.0	26.7	5.3	0.35
31	194	45.6	30.6	13.5	5.5	4.9	1.49
32	241	23.0	34.7	29.3	6.4	6.6	0.66
33	127	46.9	19.6	11.4	11.4	10.6	2.39
34	344	38.8	31.9	10.2	7.6	11.5	1.22
35	191	37.9	44.7	7.4	6.2	3.8	0.85
36	243	55.7	35.8	6.8	0.6	1.1	1.56
37	150	43.7	42.6	7.6	4.7	1.4	1.03
38	344	16.6	29.5	32.2	18.9	2.7	0.56
39	186	53.7	35.9	2.8	2.8	4.7	1.50
40	300	41.9	30.7	10.9	9.3	7.2	1.36
41	118	46.0	27.3	10.5	9.0	7.1	1.68
42	135	19.9	42.5	26.5	8.7	2.3	0.47
43	314	44.4	38.7	7.1	6.1	3.8	1.15
44	228	44.9	25.2	20.6	3.5	5.7	1.78
45	315	39.0	42.2	8.4	5.7	4.6	0.92
46	294	37.1	43.0	6.8	5.9	7.3	0.86
47	327	36.1	39.5	12.3	7.1	4.9	0.91
48	341	53.8	33.3	7.3	3.5	2.1	1.52
49	405	44.6	32.9	13.7	4.8	4.1	1.36
50	167	42.8	32.6	11.6	7.6	5.7	1.31
ORT	268.980	45.838	32.040	12.650	5.738	3.720	1.535
SD	98.649	11.529	6.713	6.563	4.436	2.544	0.618

Tablo 2: Kontrol Grubunu Oluşturan Bireylerin Total LDH Miktarları (Ünite/Litre), LDH İzoenzimleri ve LDH-1/LDH-2 oranlarına ait Bulgular.

No	Total	LDH-1 %	LDH-2 %	LDH-3 %	LDH-4 %	LDH-5 %	LD1/LD2
K-1	204	56.8	29.0	7.2	5.1	1.9	1.96
K-2	162	40.8	39.1	8.3	5.7	6.1	1.04
K-3	319	60.8	23.1	12.1	2.5	1.5	2.63
K-4	242	55.9	37.3	3.8	1.5	1.5	1.50
K-5	168	49.4	28.3	11.0	2.2	9.0	1.75
K-6	314	46.0	20.0	22.7	3.5	7.7	2.30
K-7	213	55.3	24.4	11.5	4.1	4.6	2.27
K-8	316	58.2	27.2	11.3	1.3	1.9	2.14
K-9	268	48.5	28.0	15.0	5.8	2.8	1.73
K-10	230	63.5	22.4	10.6	2.1	1.3	2.83
K-11	211	58.3	21.5	11.9	5.2	3.1	2.71
K-12	328	47.5	20.0	17.4	11.3	3.8	2.38
K-13	329	45.5	32.2	11.4	7.7	3.3	1.41
K-14	294	42.7	26.6	15.1	6.9	8.7	1.61
K-15	358	52.7	26.9	13.3	3.3	3.7	1.96
K-16	300	41.8	38.7	13.8	5.5	1.4	1.08
K-17	316	43.1	22.4	16.9	10.9	6.9	1.92
K-18	292	60.4	23.4	13.2	1.4	1.5	2.58
K-19	213	49.8	32.5	12.3	2.8	2.5	1.53
K-20	153	45.4	47.0	3.2	2.7	1.8	0.97
K-21	213	42.2	38.2	11.0	5.5	3.1	1.10
K-22	234	39.4	40.4	11.9	5.5	2.8	0.98
K-23	168	33.0	38.8	21.3	5.0	1.9	0.85
K-24	204	41.2	33.0	14.6	7.5	3.6	1.25
K-25	279	47.1	28.9	14.9	4.2	4.8	1.63

Tablò.2. devamı

K-26	162	39.1	27.7	16.3	10.5	6.4	1.41
K-27	168	27.8	28.8	13.5	13.3	16.8	0.97
K-28	219	29.7	31.8	20.0	15.2	3.2	0.93
K-29	153	40.9	38.3	10.2	1.3	9.4	1.07
K-30	204	34.2	25.6	14.1	20.3	5.8	1.34
K-31	279	32.6	32.3	19.2	14.3	1.7	1.01
K-32	294	36.0	24.0	22.8	9.1	8.0	1.50
K-33	230	47.7	30.0	10.0	6.6	5.7	1.59
K-34	204	43.6	39.6	5.9	7.1	3.8	1.10
K-35	153	48.4	37.6	3.9	6.0	4.0	1.29
K-36	234	43.0	29.9	14.0	6.0	7.1	1.44
K-37	213	39.2	30.5	22.7	2.1	5.5	1.29
K-38	211	44.2	42.5	7.0	3.3	3.0	1.04
K-39	314	37.3	28.3	20.0	8.1	6.2	1.32
K-40	411	44.4	25.4	15.4	9.1	5.6	1.75
K-41	204	39.3	28.6	16.7	7.3	8.2	1.37
K-42	132	30.0	30.9	21.5	12.7	5.0	0.97
K-43	189	53.4	36.2	5.1	2.6	2.7	1.48
K-44	168	46.0	29.0	12.5	7.1	5.4	1.59
K-45	162	35.4	33.6	18.7	9.1	3.1	1.05
K-46	168	38.1	29.1	18.0	8.7	6.1	1.31
K-47	177	44.5	33.2	10.8	7.0	4.5	1.34
K-48	198	48.9	32.3	10.6	5.5	2.7	1.51
K-49	162	43.1	31.3	13.0	7.1	5.4	1.38
K-50	279	39.5	23.1	19.0	13.5	4.8	1.71
ORT	232.320	44.632	30.578	13.532	6.514	4.626	1.537
SD	64.321	8.328	6.158	4.989	3.940	2.802	0.502

Tablo 3: İstatistiksel verileri değerlendirme tablosu

	KONTROL		HASTA		t	P
	ORT	± SD	ORT	± SD		
Total LDH	232.020	±64.321	268.980	±98.649	2.201	P < 0.05
LDH-1 %	44.632	± 8.328	45.838	±11.529	0.598	P > 0.05
LDH-2 %	30.578	± 6.158	32.040	± 6.713	1.135	P > 0.05
LDH-3 %	13.532	± 4.989	12.650	± 6.563	0.757	P > 0.05
LDH-4 %	6.514	± 3.940	5.738	± 4.436	0.926	P > 0.05
LDH-5 %	4.626	± 2.802	3.720	± 2.544	1.696	P > 0.05
LD1/LD2	1.537	± 0.502	1.535	± 0.618	0.018	P > 0.05

TARTIŞMA

LDH izoenzimlerin ayrımında Kağıt, Nişasta jel, Agar jel ve Selüloz Asetat gibi birçok elektroforez yöntemi uygulanmaktadır. Bununla birlikte, birçok araştırmacının(9,10,11,12) tanımladığı ve serum proteinlerinin ayrımında kullanılan PAGE yöntemi, seperasyon zamanının daha kısa olması ve LDH izoenzim ayrımında fraksiyonların daha belirgin şekilde ortaya konulabilmesi gibi daha üstün noktaları vardır(9,15). Bu nedenle tercih edilmiştir.

Serum örneklerinde LDH izoenzimlerin ayrıştırılması hemen yapılmalıdır. Eğer, örnekler hemen çalışılmayacaksa, -65°C'de saklanması gerekmektedir. Yoksa, LDH izoenzim miktarlarında önemli bir azalma gözlemlendiği bildirilmektedir(9) Bu nedenle örnekler hemen çalışılmıştır.

Elektroforezde örnek üzerine uygulanan sukroz miktarı densitometrik değerlendirmede önemli olduğu ve bu miktarın 30 µl/tüp olarak uygulanması gerektiği bildirildiği için bu şekilde uygulanmıştır(9).

Normal serumda LDH-2, LDH-1den daha fazladır. Böylece LDH-1/LDH-2 oranı 1'den küçüktür. İskemik kalp hastalarında, LDH'nin total miktarının ve özellikle izoenzimlerinin herbirinin düzeyinin bilinmesi hastalığın prognozunun daha yakından izlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, LDH izoenzimlerinin düzeylerinin ve birbirine göre oranlarının bilinmesi birçok hastalığın (Folik asit ve B12 vitamini düzensizliğine bağlı megaloblastik anemi, dolaşım sistemi hastalıkları, karaciğer hastalıklarında, malign hastalıklarda vs.gibi) tanısının konulmasında yardımcı olmaktadır. Çünkü, kalpteki

rahatsızlıkta kalp enzimleri LDH-1'in, Karaciğer ve iskelet kası rahatsızlıklarında LDH-5'in aktivitesi artmakta ve bunlar kan dolaşımına verilmektedir(2,4,8).

Araştırma sonucunda, LDH-1/LDH-2 oranı Kontrol Grubunda 1.537 ± 0.502 , Hasta Grubunda 1.535 ± 0.618 bulunmuştur. Bu durum yöresel özelliklere bağlı olduğu düşünülmektedir. Total LDH miktarının hasta grubunda anlamlı düzeyde ($P < 0.05$) artmış olduğu gözlenmiştir. Bu durum yapılan çalışmalara uygunluk göstermektedir(3,7,9,13). LDH izoenzim düzeyleri bakımından Hasta ve Kontrol grubu arasında farklılık gözlenmemesine karşın, LDH izoenzim düzeylerinin daha çok miyokardial enfarktüsü geçirmiş bireylerde özellikle ilk 24 saatte yükseldiği daha sonraki dönemlerde yavaş yavaş normal düzeye düştüğü bildirilmektedir(2,13). Bu nedenle araştırmaların bu konuda yoğunlaştırılması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Giblett ER.:Genetic markers in human blood. First Published, Oxford, Blackwell Scientific Publications 1969, pp.520-524.
- 2- Gözükara EM.:Biyokimya. Ofset Repromat Ltd.Şti.Ankara 1990 s. 655, 812.
- 3- Moss DW. and Henderson AR.:Enzymes.In Burtis, C.A. and Ashwood, E.R.:Tietz Textbook of Clinical Chemisrty. Second Edition. Philadelphia W.B. Saunders Company. 1994 pp. 812-825.
- 4- Murray RK., Mayes PA., et al.:Harper'ın Biyokimyası. Çevirenler:Menteş G. ve Ersöz B. Banş Kitapevi. İstanbul, 1993, s.79-80, 867.
- 5- Başaran N.:Tıbbi Genetik Ders Kitabı. Geliştirilmiş ve Düzeltilmiş ikinci baskı. Anadolu Üniversitesi Eğitim, Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları No:6 Eskişehir, 1984, s.318-321.
- 6- Stanbury JB., Wyngaarden JB., et al.:The metabolic basis of inherited disease. Fifth Edition. Mc Graw-Hill Book Company, New York 1983, pp 4-7.
- 7- Lehninger AL., Nelson DL., and Cox MM.:Principles of Biochemistry. Second Edition, Worth Publishers, New York, 1993, pp 433.
- 8- Calbreath DF.:Clinical Chemistry. A Fundamental Textbook. Philadelphia W.B. Saunders Company. 1992 pp.211-214.
- 9- Dietz AA. and Lubrano T.:Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis. Analytical Biochemistry 20:246-257, 1967.
- 10- Raymond S.:Acrylamide gel electrophoresis. Ann.N.Y.Acad.Sci 121:350-365, 1964.
- 11- Saoji AM. and Khare PM.:Polyacrylamide gel disc electrophoresis (PAGDE). Part-III.J.Pathol.Microbiol.28:285-292, 1985.
- 12- Clarke JT.:Simplified "Disc(Polyacrylamide gel)" electrophoresis. Ann.N.Y.Acad.Sci.121:428-435, 1964.
- 13- Epstein E. and Karcher RE.:Electrophoresis. In Burtis CA. and Ashwood, E.R.:Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Second Edition. Philadelphia W.B. Saunders Company. 1994 pp.191-205.
- 14- Özdamar K.:Biyostatistik 2.Baskı. Bilim Teknik Yayınevi, Eskişehir 1989, s.263-267.
- 15- Simon K., Chaplin ER. and Diamond I.:Separation of lactate dehydrogenase isoenzyes in rat brain by acrylamide-gel electrophoresis. Analytical Biochemistry, 79:571-574, 1977.