

Laborator 8 Medicină

Oxidoreductaze cu valoare diagnostică. Determinarea activității lactat dehidrogenazei. Caracterizarea izoenzimelor LDH. Importanța diagnostică în infarct miocardic, afecțiuni hepatobiliare, neoplasme.

Activitatea enzimelor se determină prin măsurarea scăderii concentrației substratului sau creșterii concentrației produsului de reacție format în condiții optime de pH, temperatură, concentrație de substrat.

Timpul de incubare a unei enzime cu substratul în condiții optime variază de la o enzimă la alta și nu trebuie să depășească o oră. Timpul limitat este impus de următorii factori: *menținerea proporționalității între concentrația substratului transformat în timp, evitarea denaturării enzimei și apariția produșilor finali de reacție în concentrații care să inhibe activitatea enzimei, împiedicarea contaminării bacteriene.*

Concentrația substratului în mediul de reacție se determină în funcție de valoarea constantei Michaelis, k_M , ce caracterizează *afinitatea enzimei pentru substratul său* (de 10-100 ori mai mare decât k_M).

Metodele de determinare a activității enzimaticice sunt:

- metode cu timp fix de incubare;*
- metode cinetice – variante ale testului optic.*

Determinarea cantității de substrat transformat sau de produs de reacție format prin ambele tipuri de metode poate fi urmărită prin:

- metode colorimetrice și spectrofotometrice;
- metode titrimetrice;
- metode gazometrice.

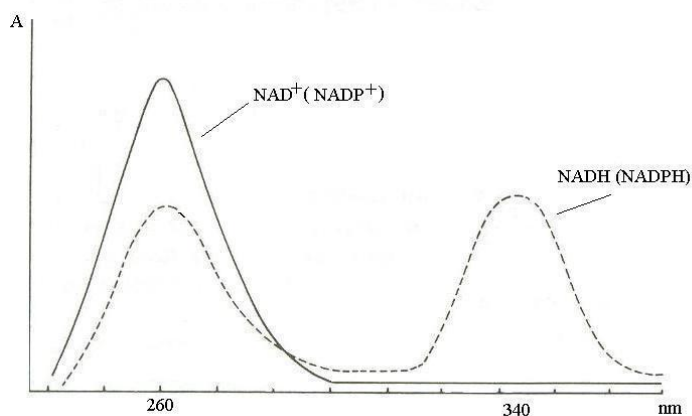
Metode cu timp fix de incubare

În acest caz se folosește un *martor (cu enzima inactivată)* și o *probă cu enzima activă*. Cele două se mențin un anumit timp în condiții optime. După aceea se inactivează și enzima din proba respectivă. În final, se determină fie cantitatea de produs format, fie cantitatea de substrat transformat printr-o metodă dintre cele menționate. Se face diferența dintre valoarea martorului și cea a probei pentru a obține cantitatea de substrat transformată de enzimă și se raportează la timpul de incubare.

Metode cinetice

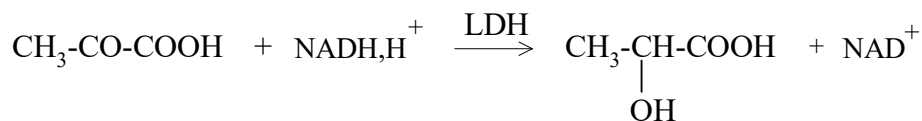
În acest tip de metode se urmărește continuu mersul reacției în timp. Cea mai folosită metodă este testul optic propus de Warburg pentru a determina activitatea enzimelor care, direct sau în reacții cuplate, folosesc drept coenzime NAD^+ (NADP^+) sau NADH, H^+ (NADPH, H^+).

Acest test se bazează pe observația că formele reduse (NADH, H^+ , NADPH, H^+) au un maxim de absorbție specific între 300-370 nm (mai pronunțat la 340 nm). Formele oxidate nu absorb în acest interval (au doar un maxim de absorbție la 260 nm, datorat adeninei).



Exemplu:

Pentru determinarea activității lactat dehidrogenazei (LDH) din plasmă, reacția este următoarea:



Se prepară o probă de plasmă cu NADH,H⁺ în tampon cu pH 7,4. Se incubează și se citește absorbția la 340 nm. Inițial va avea o valoare maximă ce va scădea pe măsură ce se adaugă substratul (acid piruvic). Scăderea absorbției este proporțională cu activitatea enzimei.

Oxidoreductaze cu valoare diagnostică

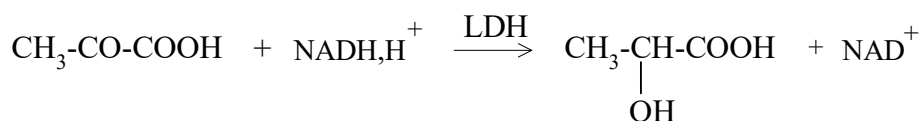
Sunt enzime care catalizează reacții de oxidoreducere. Există mai multe subclase de oxidoreductaze:

- dehidrogenaze – catalizează reacții cu transfer de electroni și de protoni;
- oxidaze – transferă 2 electroni de la donor la oxigen, cu formare de apă oxigenată;
- oxigenaze – încorporează doi atomi de oxigen în substrat;
- peroxidaze – utilizează apa oxigenată ca oxidant;
- catalaze – degradează apa oxigenată;
- hidroxilaze – încorporează oxigenul în substrat ca grupare –OH.

Au drept coenzime NAD⁺, FAD.

Determinarea activității lactat dehidrogenazei (LDH)

Lactat dehidrogenaza catalizează reacția de transformare a piruvatului în lactat, în condiții de anaerobioză:



Intensitatea activității LDH în organe scade în ordinea rinichi, inimă, mușchi scheletici, pancreas, splină, ficat, plămân. Enzima din plasmă provine din aceste organe, este redusă cantitativ în condiții normale și crește în cazul unor afecțiuni ale organelor ce o conțin.

Reactivi:

1. Tampon Tris-HCl 0,2 M, pH =7,4;
2. Soluție NADH,H⁺ 6 mg/ml în tampon Tris-HCl;
3. Soluție de piruvat de sodiu 3,3 mg/10 ml în tampon Tris-HCl;
4. Preparat proteic cu activitate lactat dehidrogenazică (plasmă sau un omogenat obținut din 1 g țesut muscular în 50 ml apă distilată, extras 1 h la 4°C și centrifugat la 6000 rpm timp de 15 minute, la –5°C.

Mod de lucru: Se incubează în cuva spectrofotometrului, timp de 5 minute, 1,6 ml tampon Tris-HCl cu 0,1 ml NADH,H⁺ și 0,1 ml plasmă sau alt preparat enzimatic. Se controlează extincția timp de 1 minut și apoi se declanșează reacția enzimatică adăugând 0,1 ml soluție piruvat de sodiu. Se citește extincția la fiecare 30 de secunde. Se calculează scăderea extincției timp de 3 minute.

Calcul: UI = ΔE/min x 2120 μmol/min/l

Valoarea normală a activității plasmatice este de 207-414 UI la 37°C. Activitatea LDH poate fi crescută după eforturi fizice intense.

Variații patologice. Activitatea LDH crește în infarct miocardic, afecțiuni hepatice, afecțiuni pulmonare, neoplasme. Pentru a interpreta corect modificarea activității LDH, trebuie să se determine activitatea totală, dar să se și studieze izoenzimele.

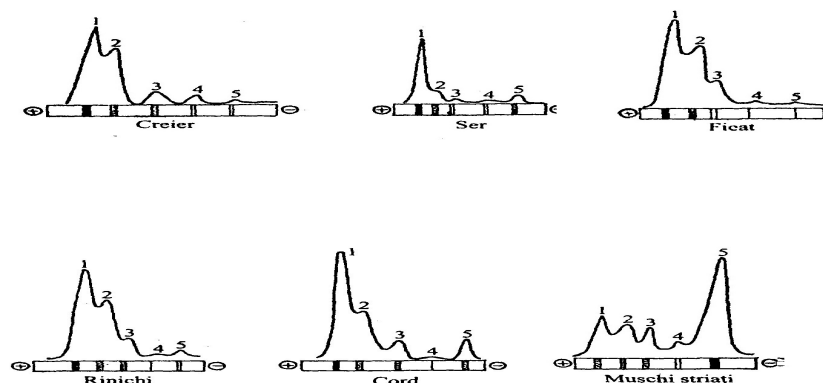
Caracterizarea izoenzimelor LDH

Enzima este un tetramer, ce poate conține două tipuri de lanțuri (M, muscle și H, heart), sintetizate diferit în țesuturi: lanțul de tip M este sintetizat predominant în țesuturile ce realizează oxidarea glucozei în condiții de anaerobioză și realizează intens transformarea piruvatului în lactat, iar lanțul de tip H, din formele cu capacitate redusă de transformare în lactat, este sintetizat predominant în țesuturile ce realizează catabolism aerob.

LDH prezintă 5 izoenzime LDH1 (H₄), LDH2 (H₃M), LDH3 (H₂M₂), LDH4 (H₁M₃), LDH5 (M₄) în ficat și mușchi. LDH1 și LDH5 sunt formele parentale, celelalte sunt hibride.



Izoenzimele se pot separa în gel de agaroză sau pe acetat de celuloză, având încărcare electrică diferită.



Distribuția izoenzimelor lactat dehidrogenazei în țesuturi

În condiții normale, plasma conține predominant fracțiunea LDH₂, celelalte fiind în proporție redusă.

Modificarea raportului între fracțiuni poate caracteriza o afecțiune hepatică (cresc LDH₄ și LDH₅), un infarct miocardic (crește LDH₁) sau un proces tumoral (creșteri ale tuturor fracțiunilor).

Semnificația diagnostică a LDH și izoenzimelor LDH. *Activitatea LDH crește moderat în infarctul miocardic acut și infarctul pulmonar.* În cazul infarctului miocardic, LDH crește după 12-24 ore, atinge maximum între 48-72 ore și revine la normal în aproximativ 10 zile. Menținerea unei valori crescute spre sfârșitul acestui interval indică un prognostic nefavorabil al bolii. Pentru o mai exactă diagnosticare este indicată determinarea izoenzimelor. O relație LDH₁ > LDH₂ corelată cu o activitate CK-MB > 6% furnizează criteriul cel mai bun pentru

detectarea infarctului. Dacă $LDH_2 > LDH_1$ iar $CK-MB > 6\%$ se înregistrează afectare miocardică dar nu infarct.

Izoenzima LDH_1 se mai poate determina ca *α -hidroxibutirat dehidrogenaza (α -HBDH)* dacă nu este posibilă separarea izoenzimelor LDH. Este crescută în infarct miocardic, deoarece înregistrează aceeași variație ca și enzima totală.

LDH și izoenzima ei LDH_5 au valori crescute în situația inflamării parenchimului hepatic și pot fi utilizate pentru diagnosticarea unei afecțiuni hepatice. Se înregistrează creșteri moderate în hepatita virală și în ciroza hepatică, iar valori mai crescute în carcinomul hepatic.

LDH este frecvent crescută în diferite procese maligne, mai ales în leucemii și limfoame. Activitate $LDH_5 > LDH_1$ se poate înregistra în tumori de colon și de sân.