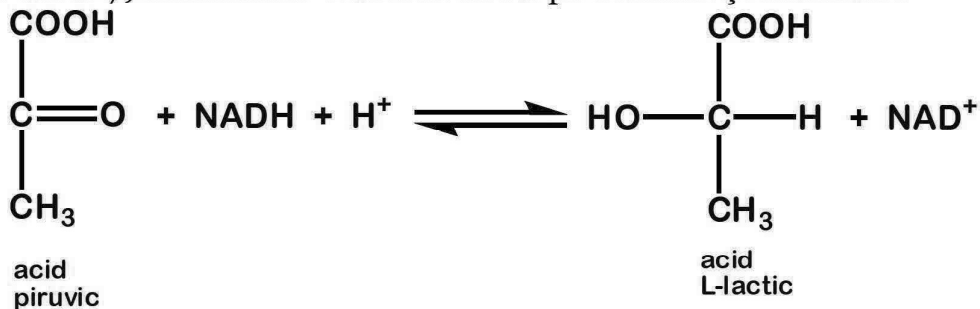


1.3.2.4. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII LACTAT DEHIDROGENAZEI

Lactat dehidrogenaza (LDH; L-lactat: NAD-oxidoreductaza, E.C. 1.1.1.27) catalizează interconversia piruvatului și lactatului:



LDH se întâlnește în majoritatea organelor și țesuturilor de origine animală și vegetală, precum și în microorganisme, fiind o enzimă importantă a căii glicolitice și fermentației lactice. La om cea mai mare activitate a LDH s-a decelat în rinichi, mușchiul cardiac, mușchii scheletici, pancreas, splină, ficat, plămâni, ser sanguin.

LDH se găsește în eritrocite, de aceea *serul sanguin folosit pentru analiză trebuie să fie proaspăt și fără urme de hemoliză*.

Cercetarea activității totale a LDH contribuie la cunoașterea intensității proceselor oxido-reducătoare din organismul animal (uman) iar determinarea activității izoenzimelor LDH facilitează stabilirea diagnosticului în unele boli ale inimii, ficatului și altor organe.

1.3.2.4.1. Determinarea activității lactat dehidrogenazei în serul sanguin

*(metoda Sevela și Tovarek în modifi cația lui Korovkin,
după Vlad Artenie și Elvira Tănase)*

Principiul metodei. Acidul L-lactic în mediu alcalin sub acțiunea LDH din serul sanguin și a NAD^+ exogen se oxidează în acid piruvic. După cantitatea de piruvat, care se dozează cu ajutorul 2,4-dinitrofenilhidrazinei, se apreciază activitatea enzimei.

Reactivi. 1) *Soluție de lactat de sodiu 0,45 M.* Într-un balon cotate de 100 ml se introduc 5 ml acid L-lactic 80 % (10 ml 40 %) și se neutralizează cu soluție de NaOH 2 N până la pH = 7,5. Volumul se completează la semn cu apă bidistilată.

2) *Soluție de pirofosfat de sodiu 0,03 M (pH=8,8).* Se dizolvă 6,69 g pirofosfat de sodiu ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) în 200 - 250 ml apă bidistilată. Se stabilește pH-ul soluției la 8,8 cu ajutorul unei soluții de HCl 1N și se completează volumul la 500 ml cu apă bidistilată. Reactivul este stabil în decurs de o lună la frigider.

3) *Soluție de NAD^+ .* Se dizolvă 6 mg de nicotinamid adenin dinucleotid oxidat (NAD^+) în 2 ml de apă bidistilată. Reactivul este stabil 4 săptămâni la frigider.

4) *Soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină 1 mM în soluție de acid clorhidric 1 N.* Se dizolvă 19,8 mg 2,4-dinitrofenilhidrazină în 100 ml soluție HCl 1 N.

5) *Soluție de NaOH 2 N.* Se dizolvă 4,1 g NaOH în 50 ml apă bidistilată, la balon cotat.

6) *Soluție de NaOH 0,4 N.* Se dizolvă 8,2 g NaOH în 500 ml apă distilată, la balon cotat.

7) *Soluție de HCl 1N.* Se diluează 9 ml de HCl concentrat la 100 ml cu apă bidistilată.

8) *Soluție etalon de piruvat de sodiu.* Se dizolvă 12,5 mg piruvat de sodiu în 100 ml apă distilată, la balon cotat.

Modul de lucru. Pentru determinarea activității enzimei se va proceda conform tabelului ce urmează:

	Probă	Martor	Amestec de reacție (eprubeta 3)
Soluție de NAD ⁺ (ml)	0,3	0,3	-
Ser sanguin diluat cu apă distilată 1: 2 (ml)	0,1	-	-
Soluție de pirofosfat de sodiu (ml)	-	-	4
Soluție de lactat de sodiu (ml)	-	-	1
Incubare pe baie de apă (sau termostat) timp de 5 minute la 37°C			
Amestec de reacție (eprubeta 3) (ml)	1	1	
Agitare ușoară și incubare 15 minute la 37°C			
Soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină (ml)	0,5	0,5	
Ser sanguin diluat cu apă distilată 1: 2 (ml)	-	0,1	
Agitare ușoară și repaus 20 minute la temperatura camerei			
Soluție de NaOH 0,4 N (ml)	5	5	
Agitare ușoară și repaus 15 minute la temperatura camerei			
Citire la $\lambda=536\text{nm}$, față de apă distilată			

Calculul rezultatelor. Activitatea lactat dehidrogenazei se calculează după curba etalon construită cu soluție etalon de piruvat de sodiu, conform indicațiilor din tabelul următor.

Schema construirii curbei de etalonare

Număr eprubetă ⇒	1	2	3	4	5	6
Acid piruvic (μg)	5	10	15	20	25	30
Soluție de piruvat de sodiu (ml)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
Apă distilată (ml)	0,55	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3
Soluție de pirofosfat de sodiu (ml)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Soluție de 2,4 - dinitrofenilhidrazină (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Agitare ușoară și repaus 20 minute la temperatura camerei						
Soluție de NaOH 0,4 N (ml)	5	5	5	5	5	5
Agitare ușoară și repaus 15 minute la temperatura camerei						
Citire la $\lambda=536\text{nm}$, față de apă distilată						

Diferența între extincția probei și extincția martorului arată cantitatea de acid piruvic formată în timpul incubăției sub acțiunea LDH. Activitatea LDH se exprimă în micromoli acid piruvic rezultați sub acțiunea enzimei dintr-un ml de ser sanguin, în timp de 1 minut la 37°C.

Folosind curba etalon, activitatea lactat dehidrogenazei se poate calcula după formula:

$$\text{micromoli acid piruvic / ml} \times \text{minut} = (a_{\text{cer}} - a_{\text{mar}}) \times \frac{3}{0,1} \times \frac{1}{15} \times \frac{1}{88}$$

în care: a_{cer} este cantitatea de piruvat (în micrograme) din probă;

a_{mar} este cantitatea de piruvat (în micrograme) din martor, iar

88 reprezintă masa unui micromol de acid piruvic în micrograme.

1.3.2.4.2. Determinarea activității lactat dehidrogenazei în serul sanguin

(metoda Wroblewski și La Due, modificată de Hill, după Vlad Artenie și Elvira Tănase)

Principiul metodei. Metoda se bazează pe măsurarea vitezei de oxidare a NADH în timpul reacției de transformare a acidului piruvic în acid lactic. Viteza de oxidare a NADH se estimează după scăderea extincției la 340 nm.

Reactivi. 1) *Soluție de piruvat de sodiu 0,01M.* Se dizolvă 27,5 mg piruvat de sodiu în 25 ml soluție tampon de fosfați 0,1 M cu pH 7,8.

2) *Soluție de NADH 0,001%.* Înainte de utilizare, se dizolvă 3 mg NADH în 3 ml de apă bidistilată.

3) *Soluție de carbonat de sodiu 1%.*

4) *Soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1M cu pH 7,8.* Se dizolvă 0,2346 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ și 6,5558 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ în 200 ml apă bidistilată, la balon cotate.

5) *Amestec de soluție tampon și substrate.* În momentul utilizării se prepară amestecul alcătuit din 1 ml soluție de piruvat de sodiu, 25 ml

soluție tampon de fosfați, 1 ml soluție de carbonat de sodiu și 3 ml soluție de NADH. Amestecul se agită cu atenție.

Modul de lucru. Se măsoară câte 2,9 ml amestec de soluție tampon-substrate în 2 eprubete și se introduc pentru 10 minute într-o baie de apă cu temperatura de 37°C. Apoi, într-o eprubetă (proba) se pipetează repede 0,1 ml ser sanguin diluat cu apă bidistilată (0,1 ml ser + 0,9 ml apă bidistilată, termostatăată la 37°C). Conținutul eprubetei se agită și se transvazează în cuva spectrofotometrului. Grosimea cuvei să fie de 1 cm. Măsurarea extincției probei se face la 340 nm, față de soluția din a doua eprubetă în care s-a adăugat 0,1 ml apă bidistilată. Se citește valoarea extincției: E_1 . Apoi, proba se incubează 30 minute într-o baie de apă la 37°C. Se citește a doua extincției: E_2 .

Calculul rezultatelor. Activitatea LDH se exprimă în milimicromoli de substrat transformat de enzima din un ml ser în timp de 1 minut. Calculul se realizează prin formula:

$$\frac{\text{Milimicromoli piruvat}}{1 \text{ ml} \times 1 \text{ minut}} = \frac{\Delta E \times 100 \times 1000}{30 \times 2,07},$$

unde: $\Delta E = E_1 - E_2$;

30 – timpul de incubație, în minute;

100 – gradul de diluție a serului;

2,07 – coeficientul de extincție la 340 nm pentru 1 micromol de NADH conținut în 3 ml soluție;

1000 – transformarea în milimicromoli.

I.3.2.4.3. Determinarea activității izoenzimelor lactat dehidrogenazei

În țesuturile umane și animale au fost identificate 5 izoenzime ale lactat dehidrogenazei (LDH): LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄ și LDH₅. Molecula oricărei izoenzime a LDH constă din 4 subunități polipetidice care pot fi de două tipuri: M (muscle) și H (heart). Aceste tipuri M și H sunt determinate genetic, respectiv sinteza lor este controlată de gene diferite. Cele 5 izoenzime ale LDH rezultă din combinarea în proporții definite a subunităților menționate. Compoziția izoenzimelor LDH poate fi redată astfel: LDH₁ – H₄, LDH₂ – H₃M, LDH₃ – H₂M₂, LDH₄ – HM₃ și LDH₅ – M₄.

Izoenzimele LDH se numerează în raport cu mobilitatea lor electroforetică la pH=8,3. În gel de amidon și de poliacrilamidă, LDH₁ este izoenzima cu mobilitatea electroforetică cea mai mare spre anod, iar LDH₅ este izoenzima cu mobilitatea electroforetică cea mai mică; formele hibride LDH₂, LDH₃ și LDH₄ prezintă mobilități intermediare.

Raporturile dintre activitățile celor cinci izoenzime ale LDH sunt caracteristice fiecărui organ. În țesuturile cu profil metabolic oxidativ (creier, inimă) predomină izoenzimele LDH₁ și LDH₂; în țesuturile cu metabolism glicolitic (anaerob) pronunțat cum sunt mușchii striati predomină izoenzimele LDH₅ (în special) și LDH₄. Izoenzimele LDH din