

**ΑΣΚΗΣΗ 8**  
**ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ :**  
**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ**

**Σκοπός της άσκησης**

- Η εισαγωγή των φοιτητών στην ενζυμική και κλινική ανάλυση
- Η εξοικείωση τους με τις έννοιες της διεθνούς μονάδας ενεργότητας (IU), των ορών ελέγχου (φυσιολογικός-παθολογικός) και των τιμών αναφοράς διαφόρων βιοχημικών μορίων
- Ο προσδιορισμός της ενζυμικής συγκέντρωσης (ή ενεργότητας) της LDH σε φυσιολογικό και παθολογικό ορό

**1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η γαλακτική αφυδρογονάση (EC 1.1.27., L-Lactate: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase, LDH) είναι μεταλλοένζυμο (περιέχει Zn<sup>2+</sup>) μοριακού βάρους περίπου 134 KDa, καταμετρημένο σε ολόκληρο σχεδόν το ανθρώπινο σώμα. Η γαλακτική αφυδρογονάση του ανθρώπου απαντάται σε πέντε διακριτές μορφές (ισοένζυμα) οι οποίες αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και είναι: LD-1 (HHHH), LD-2 (HHHM), LD-3 (HHMM), LD-4 (HMMM) και LD-5 (MMMM), όπου H = heart και M = muscle.

Βρίσκεται σε υψηλές ενεργότητες στο κυτταρόπλασμα, σε ιστούς όπως η καρδιά, το ήπαρ, τα νεφρά και οι σκελετικοί μύες. Σε μικρότερες ποσότητες βρίσκεται στον πνεύμονα, στα ερυθροκύτταρα, στον εγκέφαλο και στο πάγκρεας. Λαμβάνει μέρος στο γλυκολυτικό στάδιο, στην αναερόβια οξείδωση της γλυκόζης. Στους ιστούς τα επίπεδα της LDH είναι περίπου 500 φορές υψηλότερα από αυτά που βρίσκονται φυσιολογικά στον ορό, οπότε οποιαδήποτε διαφυγή του ενζύμου από έστω και μια μικρή μάζα του ιστού που έχει βλάβη μπορεί να αυξήσει σημαντικά τα παρατηρούμενα επίπεδα της LDH στον ορό.

Η ενεργότητα της LDH μπορεί να αυξηθεί σε μια μεγάλη ποικιλία ασθενειών. Οι αυξήσεις στην ενεργότητα της LDH στον ορό μπορεί να είναι απόλυτες (αύξηση της ολικής LDH) ή σχετικές (αλλαγή στο ποσοστό των πέντε ισοενζύμων). Ο πίνακας 1 δείχνει τις κυριότερες ασθένειες κατά τις οποίες σημειώνεται αύξηση της LDH. Το γεγονός ότι η LDH εμφανίζεται σε υψηλές ενεργότητες σε πολλές παθολογικές περιπτώσεις, καθιστά τον προσδιορισμό μη εξειδικευμένο από άποψη διαγνωστικής σημασίας. Ο προσδιορισμός, όμως εκτελείται, διότι φυσιολογικές τιμές LDH αποκλείουν σειρά ασθενειών. Αυξήσεις στην ενεργότητα της LDH στα ούρα τριπλάσιες ως και εξαπλάσιες των φυσιολογικών σχετίζονται με χρόνια σπειραματική νεφρίτιδα, ερυθρηματώδη λύκο, διαβητική νεφροσκλήρυνση και κυστικές κακοήθειες.

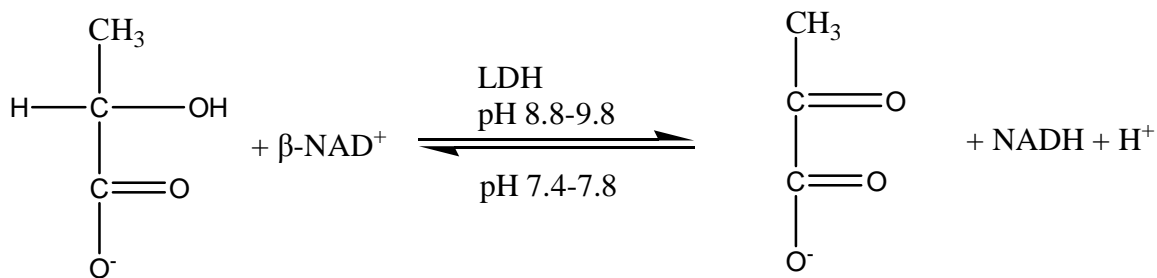
Όσον αφορά τις μεθόδους προσδιορισμού της LDH, οι οπτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά έχουν πλήρως αντικατασταθεί από κινητικές μεθόδους στο υπεριώδες (UV) εξαιτίας της χαμηλής αξιοπιστίας των οπτικών μεθόδων και της εύκολης διαθεσιμότητας στο εμπόριο φασματοφωτομέτρων ικανών για ακριβή μέτρηση στα 340 nm. Στο εργαστήριο χρησιμοποιείται η κινητική μέθοδος για την αντίδραση πυροσταφυλικό /γαλακτικό η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην Ευρώπη και έχει αναπτυχθεί από την Επιτροπή Ενζύμων της Σκανδιναβικής Ένωσης Κλινικής Χημείας και Κλινικής Φυσιολογίας.

**2.ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Η γαλακτική αφυδρογονάση καταλύει την οξείδωση του L-γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ με τη συμμετοχή του οξειδοαναγωγικού συστήματος β-NAD<sup>+</sup>/NADH. Η αντίδραση (σχήμα 1) είναι αντιστρεπτή και η ισορροπία είναι μετατοπισμένη προς την αναγωγή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ (P→L) σε pH 7.4-7.8.

**Πίνακας 1.** Ασθένειες που συνδέονται με αύξηση της ενεργότητας της LDH

| Ασθένεια   | Σχετική/Απόλυτη αύξηση  |
|--|---|
| Έμφραγμα μυοκαρδίου  | Ως και 10 φορές αύξηση που παρατηρείται 8-12 h μετά το έμφραγμα. Επαναφορά σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από 5 ή 6 μέρες. Το LD-1 είναι αυξημένο. Στην ηλεκτροφόρηση συνήθως LD-1>LD-2. |
| Συμφορητική καρδιοπάθεια, μυοκαρδίτιδα, κυκλοφορική ανεπάρκεια με καταπληξία | Αύξηση της LDH μέχρι 5 φορές.   |
| Μεγαλοβλαστική αναιμία   | Αύξηση στην ολική LDH μεγαλύτερη από 5 φορές. Αύξηση των LD-1 και LD-2.   |
| Ιογενή ηπατίτιδα, λοιμώδη μονοπυρήνωση                                       | Αύξηση ως και 5 φορές. Κυριαρχεί το LD-5.   |
| Κίρρωση, αποφρακτικός ίκτερος  | Αύξηση ως και 2 φορές. Κυριαρχεί το LD-5.   |
| Καρκίνος, μετάσταση  | Αύξηση μεγαλύτερη από 10 φορές.   |
| Μυϊκή δυστροφία  | Ως και 10 φορές αύξηση, κυρίως του LD-5.  |
| Τραυματισμός μυών από φυσική άσκηση ή ατύχημα                                | Αύξηση κυρίως του LD-5, εξαρτάται από το τραύμα.  |
| Ερυθρηματώδης λύκος  | Αύξηση στα ισοένζυμα LD-3 και LD-4.   |



**Σχήμα 2.** Αντίδραση μεθόδου προσδιορισμού γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)

Η LDH δεν δρα στο D-γαλακτικό οξύ και μόνο το  $\beta\text{-NAD}^+$  μπορεί να δράσει ως συνένζυμο στην αντίδραση αυτή. Ο ορός προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα NADH-πυροσταφυλικού οξέος, το μίγμα αφήνεται για επώαση για 1-2 min στους  $37^\circ\text{C}$  ώστε να καταστραφούν τα ενδογενή οξοοξέα. Στη συνέχεια παρακολουθείται η ελάττωση της απορρόφησης στα 340 nm στους  $37^\circ\text{C}$ . Η ενεργότητα της LDH προσδιορίζεται από την **κινητική καμπύλη** (τμήμα μηδενικής τάξης) **απορροφήσεως-χρόνου** και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε **U/L**.

Στον προσδιορισμό της ενεργότητας της LDH μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι δύο αντιδράσεις (δηλαδή η  $\text{P}\rightarrow\text{L}$  και η  $\text{L}\rightarrow\text{P}$ ). Το βέλτιστο pH για την αντίδραση  $\text{L}\rightarrow\text{P}$  είναι 8.8-9.8 και οι άριστες ποσότητες αντιδραστηρίων στους  $30^\circ\text{C}$  είναι  $\beta\text{-NAD}^+$ , 5 mmol/L και L-γαλακτικό, 50 mmol/L. Αντίθετα, για την αντίδραση  $\text{P}\rightarrow\text{L}$  το βέλτιστο pH είναι 7.4-7.8, το NADH, 150  $\mu\text{mol/L}$  και το πυροσταφυλικό οξύ, 1.5 mmol/L.

Τα πλεονεκτήματα της αντίδρασης  $\text{P}\rightarrow\text{L}$  είναι:

α) η μεγάλη σταθερά ισορροπίας ( $2.7 \times 10^{11}$ ),

β) το ποσό που απαιτείται στην αναγωγή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό είναι μόνο το 3 % του ποσού του  $\beta\text{-NAD}^+$  που χρησιμοποιείται στην οξείδωση του γαλακτικού σε πυροσταφυλικό (σημαντική μείωση του κόστους),

γ) λόγω του ότι η ταχύτητα αντίδρασης για δεδομένη ποσότητα ενζύμου είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερη για τη μετατροπή P→L απ' ό,τι για την αντίστροφη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικρότερα δείγματα και μικρότερα χρονικά διαστήματα μέτρησης χωρίς μείωση της αξιοπιστίας.

Τα μειονεκτήματα της αντίδρασης P→L είναι:

α) σε σύγκριση με την αντίστροφη της, χάνει γρηγορότερα τη γραμμικότητά της και

β) σε μερικά φιαλίδια του NADH ενυπάρχει ένας ισχυρός αναστολέας της LDH. Συνεπώς, είναι απαραίτητο πριν τη χρησιμοποίηση του NADH, να εκτιμάται η ποιότητα του αντιδραστήριου. Το β-NAD<sup>+</sup> συνήθως δεν περιέχει αναστολείς, αν και έχουν αναφερθεί μερικές εξαιρέσεις.

### 3.ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1.Συλλογή και διακίνηση δειγμάτων

Ο ορός αίματος είναι το δείγμα που επιλέγεται για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της LDH. Μπορεί, επίσης να χρησιμοποιηθεί και πλάσμα λαμβανόμενο με ηπαρίνη. Πλάσμα που περιέχει άλλα αντιπηκτικά, όπως οξαλικό, το οποίο αναστέλλει τη δράση της LDH, πρέπει να αποφεύγεται. Το ασκορβικό οξύ μπορεί να ελαττώσει την ενεργότητα της LDH. Αντίθετα, η ενεργότητά της αυξάνεται αν ο ορός δεν διαχωρισθεί αμέσως από τα ερυθροκύτταρα, τα οποία περιέχουν υψηλή ενεργότητα της LDH, κυρίως LD-1 και LD-2. Αιμολυμένα δείγματα πρέπει να απορρίπτονται.

Όσον αφορά τη σωστή αποθήκευση των δειγμάτων, ισχύουν τα εξής: εφόσον μερικά ισοένζυμα της LDH, κυρίως τα LD-4 και LD-5, είναι ευαίσθητα σε χαμηλές θερμοκρασίες, τα περισσότερα εργαστήρια συνιστούν να μείνουν τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου, αν πρόκειται να γίνει ανάλυση ισοενζύμων. Δεν παρατηρείται μείωση της ενεργότητας σχεδόν καθόλου για 2-3 d σε αυτή τη θερμοκρασία (25 °C), αν όμως το διάστημα παραμονής είναι μεγαλύτερο, προτιμάται η διατήρηση στους 4 °C με προσθήκη β-NAD<sup>+</sup> ή γλουταθειόνης για τη μείωση της ταχύτητας απενεργοποίησης των LD-4 και LD-5. Συμπερασματικά, το καλύτερο είναι το δείγμα να παραμείνει στους 25 °C και να αναλυθεί εντός 24 h από τη δειγματοληψία.

Ικτερικά και λιπαιμικά δείγματα μπορούν να αναλυθούν αν πληρούν τις παρακάτω προϋποθέσεις: α) η απορρόφηση του ορού να μην είναι μεγαλύτερη από τα όρια μέτρησης του οργάνου και β) να χρησιμοποιηθεί ένα κατάλληλο τυφλό διχρωμικών. Πολύ λιπαιμικά δείγματα ορού μπορούν να χρησιμοποιηθούν μετά από στάδιο εκχύλισης για την απομάκρυνση της θολερότητας. Η εκχύλιση εκτελείται με νερό κεκορεσμένο με αιθέρα.

#### 3.2.Όργανα

- 1) Φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης LKB, model 4089
- 2) Υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C
- 3) Καταγραφέας
- 4) Θερμόμετρο
- 5) Μικροσιφόνια ακριβείας (πιπέττες των 50 μL και 2.50 mL)
- 6) Αναδευτήρας τύπου δίνης (Vortex)

#### 3.3.Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια είναι προπαρασκευασμένα (kits):

**Αντιδραστήριο 1:** περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.5, 50 mmol/L, πυροσταφυλικό οξύ 1.20 mmol/L και EDTA 0.15% mmol/L.

**Αντιδραστήριο 2:** NADH 0.15 mmol/L

**Διάλυμα εργασίας:** Δύο mL του αντιδραστήριου 2 αναμιγνύονται με 8.0 mL του αντιδραστήριου 1. Τα αντιδραστήρια φυλάσσονται σε σκοτεινές φιάλες και είναι σταθερά για τρεις εβδομάδες στους 2-8 °C.

### 3.4.Βαθμονόμηση

Επειδή τα αποτελέσματα αναφέρονται σε διεθνείς μονάδες ενεργότητας (IU) χρησιμοποιώντας το μοριακό συντελεστή απορροφήσεως  $\epsilon_{340\text{nm}}$  του NADH ( $\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , τιμή βιβλιογραφίας), είναι απαραίτητο να μετρηθεί η απόλυτη τιμή απορροφήσεως του NADH. Συνεπώς, η προετοιμασία μιας καμπύλης αναφοράς δεν είναι απαραίτητη. Αυτό όμως απαιτεί το χρησιμοποιούμενο όργανο να βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (αυτόματη βαθμονόμηση οργάνου), ώστε να είναι βέβαιο ότι έχει γραμμικότητα σε καθορισμένη περιοχή απορρόφησης και ότι μετρά με ορθότητα τις γνωστές τιμές απορροφήσεως του NADH. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται με πρότυπο διάλυμα NADH το οποίο προκύπτει μετά από αραιώση με ρυθμιστικό διάλυμα προζυγισμένου φιαλιδίου NADH.

### 3.5.Πορεία εργασίας

- 1) Μεταφέρεται το διάλυμα εργασίας και τα δείγματα στους  $37^\circ\text{C}$ .
- 2) Μηδενίζεται το φασματοφωτόμετρο στα 340 nm ως προς τον αέρα.
- 3) Αναμιγνύονται **2.00 mL διαλύματος εργασίας και 0.020 mL δείγματος** χρησιμοποιώντας αντίστοιχες μηχανικές πιπέττες.
- 4) Αφήνεται το διάλυμα αντίδρασης για 30 sec περίπου στους  $37^\circ\text{C}$ .
- 5) Καταγράφεται η καμπύλη ταχύτητας αντιδράσεως για **3-4 min** (μέτρηση ανά 30 sec) και υπολογίζεται η κλίση σε  $\Delta\text{A}/\text{min}$ . Εναλλακτικώς, λαμβάνεται η πρώτη τιμή απορρόφησης (A1) πατώντας ταυτόχρονα το χρονόμετρο χειρός, τοποθετείται το δείγμα ξανά στο υδρόλουτρο και μετά από 5 min ακριβώς λαμβάνεται η δεύτερη τιμή απορρόφησης (A2). Αν η ταχύτητα αντίδρασης  $\Delta\text{A}/\text{min}$  είναι μεγαλύτερη από 0.10, οι μετρήσεις πρέπει να επαναληφθούν, αφού πρώτα αραιωθεί ο ορός 1:10 με φυσιολογικό ορό.

### 3.6.Επεξεργασία αποτελεσμάτων

**Διεθνής Μονάδα (IU)** ονομάζεται η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει την αντίδραση ενός  $\mu\text{mol}$  ( $10^{-6} \text{ mol}$ ) υποστρώματος ανά λεπτό, κάτω από ορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και συγκέντρωσης υποστρώματος. Η Διεθνής Μονάδα της ενζυμικής ενεργότητας εκφράζεται και ως U/L ή mU/mL.

Οι περισσότερες μέθοδοι ενζυμικής ανάλυσης χρησιμοποιούν τα χαρακτηριστικά απορρόφησης του συστήματος  $\beta\text{-NAD}^+/\text{NADH}$ . Το NADH απορροφά στα 340 nm, ενώ το  $\text{NAD}^+$  δεν απορροφά σε αυτό το μήκος κύματος (σχήμα 2). Με αυτόν τον τρόπο μπορεί κανείς να παρακολουθήσει την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης, μετρώντας είτε την αύξηση είτε τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm, αν το  $\beta\text{-NAD}^+$  ανάγεται ή το NADH οξειδώνεται, αντίστοιχα. Στην αντίδραση αναγωγής του πυροσταφυλικού οξέος σε L-γαλακτικό οξύ παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στα 340 nm. Το ποσό του παραγόμενου NADH είναι άμεσα σχετιζόμενο με το μέγεθος της ενζυμικής ενεργότητας της LDH. Η ενζυμική ενεργότητα (E) μπορεί να υπολογιστεί από τη μεταβολή της απορρόφησης ( $\Delta\text{A}$ ) του  $\beta\text{-NAD}^+$  με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$E \text{ (mU/mL)} = (\Delta\text{A} \times 10^6 \times V_t) / (t \times \epsilon \times b \times V_s)$$

Όπου:

$\Delta\text{A}$  : η μεταβολή στην απορρόφηση του δείγματος σε μια καθορισμένη χρονική περίοδο  $t$  (min),

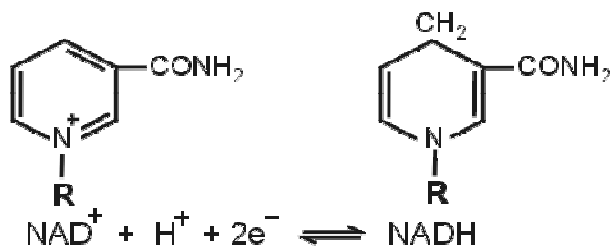
$\epsilon$  : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του NADH ( $6.22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ),

$b$  : το μήκος οπτικής διαδρομής (cm),

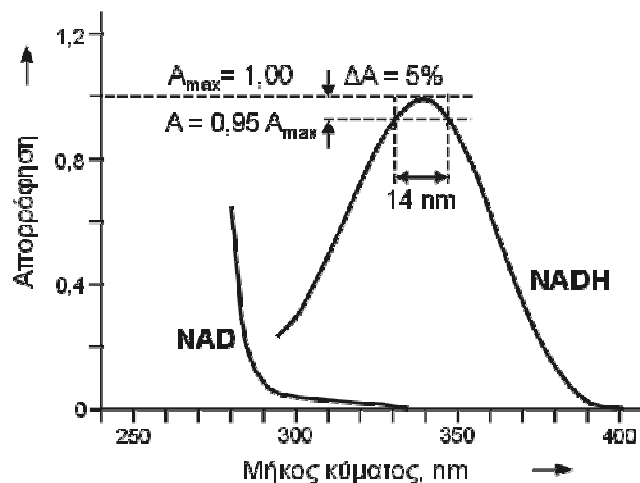
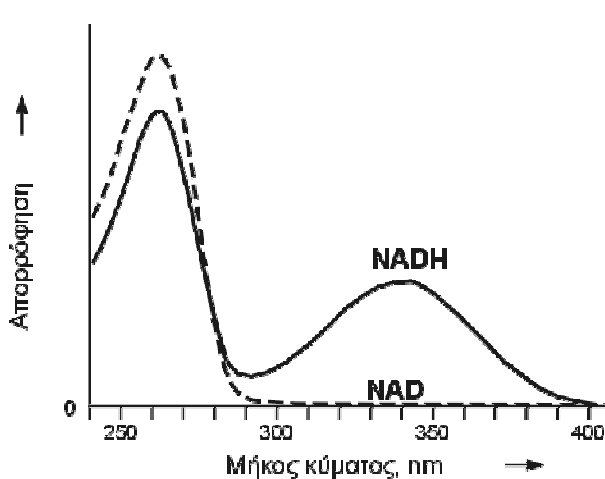
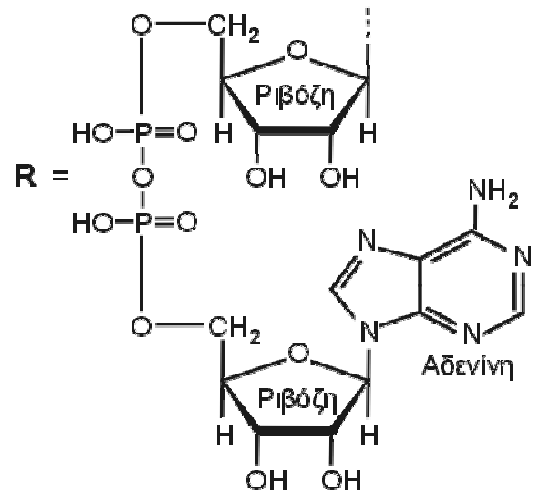
$V_t$  : ο ολικός όγκος του μίγματος της αντίδρασης (mL),

$V_s$  : ο όγκος του δείγματος (ml), και

$10^6$  : συντελεστής μετατροπής των moles σε  $\mu\text{moles}$ .



### Οξειδοαναγωγικό σύστημα NAD/NADH



Σχήμα 2. Φάσμα απορρόφησης του συστήματος β-NAD<sup>+</sup>/NADH

### 3.7. Έλεγχος αξιοπιστίας των μετρήσεων

Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των μετρήσεων προσδιορισμού της LDH διατίθενται στο εμπόριο οροί ελέγχου (control serum) για την παθολογική και φυσιολογική περιοχή με γνωστή ενζυμική ενεργότητα, δηλαδή είναι γνωστές οι τιμές και τα όρια των τιμών, όπως αυτά προσδιορίστηκαν από εργαστήρια αναφοράς. Αν το λαμβανόμενο αποτέλεσμα στο εργαστήριο αποκλίνει στατιστικώς σημαντικά, τότε πρέπει να ελεγχθούν οι παρακάτω παράγοντες, που επηρεάζουν την αξιοπιστία της μεθόδου, όπως: καθαριότητα των υαλικών, βαθμονόμηση μήκους κύματος, ευαισθησία οργάνου, θερμοκρασία και χρόνος αντίδρασης, ημερομηνία λήξεως των αντιδραστηρίων και φυσικές μεταβολές αντιδραστηρίων (μεταβολές χρώματος, αναπτύξεις μικροβίων).

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑ

### 4.1. Χαρακτηριστικά αξιοπιστίας της μεθόδου

**Εξειδίκευση:** η μέθοδος είναι εξειδικευμένη για την LDH και η σύσταση του υποστρώματος έχει βελτιστοποιηθεί, ώστε να αντιδρούν τα ισοένζυμα του φυσιολογικού ορού.

#### 4.2.Εύρος τιμών αναφοράς

Οι τιμές αναφοράς για την ολική ενεργότητα της LDH στον ορό ποικίλλουν ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται και την ηλικία του ατόμου. Για την αντίδραση  $L \rightarrow P$  στους  $37^{\circ}C$  οι τιμές κυμαίνονται από 100-225 U/L. Για την ίδια θερμοκρασία η αντίστροφη αντίδραση  $P \rightarrow L$  έχει μεγαλύτερο εύρος τιμών αναφοράς, από 90-320 U/L.

Νεογέννητα ως και 2 χρόνων έχουν τιμές μέχρι 450 U/L. Παιδιά και έφηβοι έχουν συνήθως τιμές 10%-15% υψηλότερες από αυτές των ενηλίκων. Επίσης, οι ενήλικοι άντρες έχουν ελαφρώς υψηλότερες τιμές (ως και 5%) από τις ενήλικες γυναίκες.

#### 5.ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

- 1) Ποια η διαγνωστική σημασία του προσδιορισμού της LDH;
- 2) Ποια η αρχή της μεθόδου προσδιορισμού της ενεργότητας της LDH;
- 3) Σε τι pH γίνεται ο προσδιορισμός της ενεργότητας της LDH και γιατί;
- 4) Γιατί ο κινητικός προσδιορισμός της ενεργότητας της LDH πραγματοποιείται στα 340 nm;
- 5) Γιατί ο ορός πρέπει να επωάζεται με το διάλυμα εργασίας για 2 min πριν την έναρξη της μέτρησης;
- 6) Αν το δείγμα με το διάλυμα NADH έχει απορρόφηση πάνω από 1 και το φασματοφωτόμετρο δεν έχει δυνατότητα ηλεκτρονικής αντισταθμίσεως, πώς μπορούν με χημικό τρόπο να εκτελεστούν οι κινητικές μετρήσεις;
- 7) Ποιες άλλες ουσίες κλινικής σημασίας μπορούν να προσδιοριστούν με την αντίδραση αυτή;
- 8) Γιατί προτιμάται το πλάσμα για τον προσδιορισμό της LDH;
- 9) Ποια είναι τα πλεονεκτήματα των ενζυμικών μεθόδων κατά την εφαρμογή τους;