

Selektywne oznaczanie izoenzymatycznej aktywności dehydrogenazy mleczanowej w formacie analizy przepływowej

mgr Justyna Głowacka

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH, EC 1.1.1.27) należy do grupy enzymów szeroko rozpowszechnionych w komórkach wszystkich organizmów żywych, gdzie katalizuje równowagową przemianę pirogronianu do mleczanu z udziałem NAD^+/NADH jako systemu koenzymu (jeden z etapów oddychania komórkowego). Z tego powodu jej aktywność jest uznawana za cenny parametr kliniczny w diagnostyce chorób takich jak: anemia, zawał mięśnia sercowego, jak również różnego rodzaju nowotworów. Jednakże, oznaczenie całkowitej aktywności LDH pozwala jedynie na ocenę ogólnego stanu narządów wewnętrznych lub wczesne wykrycie niewydolności narządowej. W celu uzyskania dokładniejszych informacji, zawierających lokalizację uszkodzonych komórek, należałoby oszacować skład jej izoenzymów, których proporcję zmieniają się w zależności od rodzaju choroby. Obecnie, taka analiza nie jest wykonywana rutynowo w laboratoriach klinicznych ale może zostać przeprowadzona na żądanie za pomocą kosztownych, czasochłonnych i wysoce skomplikowanych metod.

Głównym celem prezentowanego projektu jest opracowanie bioanalitycznego systemu przepływowego (opartego na działaniu mikrosolenoidowych urządzeń do sterowania przepływem) do rozróżniania i ilościowego oznaczenia aktywności izoenzymów LDH. Takie podejście powinno zapewnić precyzyjną kontrolę czasu inkubacji reakcji enzymatycznej, utrzymanie powtarzalnych warunków mieszania i detekcji, jak również redukcję zarówno zużywanych odczynników, jak i czasu trwania analizy. W trakcie badań, izoenzymy LDH zostaną podzielone na trzy grupy, uwzględniające ich położenie w ludzkim organizmie, a mianowicie LDH1 (mięsień sercowy), LDH2 i LDH3 (mózg) oraz LDH4 i LDH5 (wątroba i mięśnie). Proces identyfikacji poszczególnych frakcji izoenzymów LDH będzie związany z hamowaniem lub brakiem hamowania ich aktywności przez określone substancje. Drugim celem projektu będzie ulepszenie rutynowej, nisko czułej procedury oznaczania całkowitej aktywności LDH polegającej na monitorowaniu przyrostu stężenia NADH przy długości fali 340 nm. Zaproponowana metoda będzie oparta na wykorzystaniu silnych właściwości redukujących cząsteczki NADH w innym znanym układzie redoks z detekcją fotometryczną w zakresie widzialnym. Rolę detektora w prezentowanych badaniach będzie pełnił fotometryczny detektor optoelektroniczny, składający się z dwóch sparowanych diod elektroluminescencyjnych. Ostatecznie, użyteczność zaprojektowanego systemu zostanie potwierdzona przez analizę certyfikowanych surowic kontrolnych i rzeczywistych próbek surowicy krwi ludzkiej.