

## Determinazione della lipoamide deidrogenasi nel siero: proposta di un nuovo approccio analitico-strumentale e confronto con altri indicatori di lesione mitocondriale

Cristina Serena, Roberto Bonora, Mauro Panteghini

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia

### ABSTRACT

#### Determination of lipoamide dehydrogenase in serum: proposal of a new analytical approach and comparison with established markers of mitochondrial damage

The lipoamide dehydrogenase (LAD) is a mitochondrial flavoprotein which catalyzes the reduction of lipoamide by NADH to yield dihydrolipoamide and NAD<sup>+</sup>. The enzyme is a component of the multienzyme pyruvate dehydrogenase complex and 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. LAD can be measured in human serum and used potentially as marker of tissue damage. In order to investigate the clinical utility of LAD determination, we adapted a modification of the manual method of Pelley et al. (Clin Chem 1976;22:275) for use on the Roche Cobas Bio analyzer. The assay measures the lipoamide-dependent reduction of NAD<sup>+</sup> at 340 nm. The automated assay requires 15 µL of specimen and 140 µL of reagents containing NAD<sup>+</sup> and reduced lipoamide in tricine buffer, 50 mmol/L. Following 10 min incubation, seven absorbance readings were taken at 10 s intervals (37°C). Under the conditions described, the products of reaction increased linearly with serum LAD activities up to 300 U/L. The average percentage recovery of various quantities of commercial LAD (Sigma) was 98.7% (CV 8.0%). Analysis of total imprecision, using NCCLS-EP5 protocol on three human sera with 15.6 U/L, 34.6 U/L, and 87.3 U/L LAD activities, gave CV of 15.6%, 7.8%, and 3.7%, respectively. Triglycerides, hemoglobin, and bilirubin do not interfere up to values of 500 mg/dL, 0.25 g/dL, and 10 mg/dL, respectively. Results of LAD obtained with our method (y) well correlated with those of manual method of Pelley (x) (r=0.9947) yielding the following regression equation:  $y = 1.02x + 0.92$ , n=23. The upper reference limit, determined in a group of 33 ostensibly healthy subjects, was 19 U/L (97.5<sup>th</sup> percentile). From presented data, we conclude that our automated method may now permit studies on the clinical utility of serum LAD.

### RIASSUNTO

La lipoamide deidrogenasi (LAD) è una flavoproteina di origine mitocondriale che catalizza la reazione di riduzione della lipoamide utilizzando NADH per dare lipoamide ridotta e NAD<sup>+</sup>. L'enzima LAD può essere misurato nel siero e potenzialmente utilizzato come marcatore biochimico di danno tissutale profondo. Lo scopo di questo lavoro è stato mettere a punto un metodo di determinazione della LAD nel siero che fosse completamente automatizzato, basandosi su una modificazione del metodo manuale proposto da Pelley et al. (Clin Chem 1976;22:275), al fine di potere in seguito più facilmente studiare l'eventuale significato clinico del dosaggio. Il metodo, che sfrutta l'incremento di assorbanza a 340 nm dovuto alla riduzione del NAD<sup>+</sup> ad opera della LAD con conseguente ossidazione della lipoamide, è stato adattato all'analizzatore Cobas Bio Roche, con 15 µL di campione e 140 µL di reagente contenente NAD<sup>+</sup> e lipoamide ridotta in tampone tricina, 50 mmol/L. Dopo 10 min di incubazione, la reazione era monitorata a 37°C per 70 s con letture ogni 10 s. In queste condizioni, la reazione era lineare fino a 300 U/L di LAD ed il recupero medio di quantità scalari di LAD era pari al 98.7% (CV 8.0%). L'analisi dell'imprecisione totale, valutata utilizzando il protocollo NCCLS-EP5 su tre sieri a differente concentrazione di LAD, forniva CV di 15.6% (media, 15.6 U/L), 7.8% (media, 34.6 U/L) e 3.7% (media, 87.3 U/L), rispettivamente. Nessuna interferenza era riscontrata per concentrazioni sieriche di trigliceridi fino a 500 mg/dL, emoglobina fino a 0.25 g/dL e bilirubina fino a 10 mg/dL. Un'ottima correlazione era ottenuta nel confronto con il metodo manuale (x) su 23 campioni con diversa attività di LAD:  $y = 1.02x + 0.92$ , r=0.9947. Il limite superiore di riferimento, ottenuto non parametricamente in una popolazione di 33 individui presunti sani, era 19 U/L. In base ai dati presentati è possibile concludere che questo metodo può essere impiegato per approfondire lo studio del valore clinico della determinazione della LAD nel siero.

### INTRODUZIONE

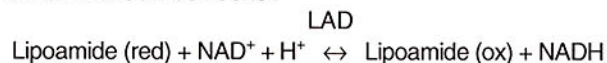
L'enzima lipoamide deidrogenasi (LAD; NADH:lipoamide ossidoreduttasi; EC 1.8.1.4) è una flavoproteina

costituita da due identiche subunità, ognuna contenente una molecola di flavina adenin dinucleotide (FAD) (1). Ciascun monomero costitutivo dell'enzima umano contiene 474 amminoacidi, pari ad un peso molecolare di circa

49.700 (2). Isolato in diverse specie, nei mammiferi l'enzima è situato nei mitocondri ed è presente principalmente nel fegato (1). Numerosi lavori hanno dimostrato l'esistenza di più forme enzimatiche, probabilmente originate da modificazioni post-traduzionali (3-6).

Fisiologicamente l'enzima è attivo nella riossidazione dell'acido diidrolipoico, legato con legame ammidico al gruppo  $\epsilon$ -amminico di un residuo di lisina presente sugli enzimi transacetilasi e transsuccinilasi, con la nicotinamide adenin dinucleotide (NAD) in funzione di accettore di elettroni (1). La riduzione dell'acido lipoico è la conseguenza della decarbossilazione ossidativa, tiamina pirofosfato-dipendente, di  $\alpha$ -chetoacidi, quali l'acido piruvico e l'acido  $\alpha$ -chetoglutarico, che porta alla formazione rispettivamente di acetil-CoA e succinil-CoA. Per questa sua funzione, l'enzima LAD è associato strutturalmente e funzionalmente con i complessi multienzimatici Piruvato Deidrogenasi e  $\alpha$ -Chetoglutarato Deidrogenasi. In questi complessi multienzimatici la LAD catalizza la riduzione della lipoamide utilizzando NADH per formare lipoamide ridotta e NAD<sup>+</sup>.

L'enzima LAD è stato misurato principalmente nel siero (7, 8), nelle piastrine (8, 9), negli eritrociti (10, 11), nei linfociti (12) e nei tessuti, principalmente nel fegato, dove si trova localizzato nei mitocondri dell'epatocita (13). Vari metodi sono stati proposti per determinare l'attività catalitica dell'enzima (7, 8, 10, 11, 14). Comune è stato l'impiego della seguente reazione, sebbene essa sia stata usata in entrambe i sensi:



In particolare, Seet e Lee (11) hanno proposto un metodo colorimetrico che sfrutta la reazione di riduzione della lipoamide, associando ad essa una seconda reazione nella quale la lipoamide ridotta reagisce con un sistema cromogeno [1,3-bis(2'-piridil)1,2-diaza-prop-2-ene] a formare un prodotto colorato, con assorbimento a 540 nm. Utilizzando tale metodo era possibile misurare l'attività dell'enzima in sospensioni cellulari, eliminando l'interferenza della torbidità delle sospensioni stesse usate come campione, che avrebbe invece potuto creare problemi seguendo direttamente l'ossidazione del NADH a 340 nm. Nel 1976, Pelley et al. hanno per primi messo a punto un metodo per la determinazione della LAD nel siero, sfruttando la misura dell'incremento di assorbanza a 340 nm dovuto alla formazione di NADH durante la reazione catalizzata dall'enzima (7). In questo metodo, l'alta specificità della LAD per il substrato lipoamide minimizza le possibili interferenze dovute ad altre sostanze ossido-riducenti che possono essere presenti nel campione biologico da analizzare. Il substrato lipoamide era disciolto in etanolo assoluto al quale veniva poi aggiunto ditiotreitolo come donatore di gruppi sulfidrilici. Con questo approccio la spontanea riduzione del NAD<sup>+</sup> in assenza dell'enzima era ridotta a livelli trascurabili.

In conseguenza della sua localizzazione mitocondriale, l'enzima LAD può essere in teoria utilizzato come marcatore biochimico di danno tissutale profondo, doven-

do tale danno essere di norma relativamente severo prima che l'enzima rilasciato dai mitocondri aumenti in circolo. Normalmente infatti l'attività di LAD nel siero è bassa o addirittura non rilevabile, gli incrementi diventando quindi indice molto sensibile di situazioni patologiche di danno tissutale profondo. Risultati preliminari hanno evidenziato aumenti di LAD sierica in pazienti con malattie epatocellulari o infarto acuto del miocardio, mentre non erano riscontrati aumenti altrettanto significativi di LAD sierica in corso di malattie emolitiche, polmonari, gastrointestinali, renali o ossee (7). Partendo da questi presupposti relativi al possibile impiego dell'enzima LAD come marcatore di lesione cellulare, in questo lavoro è stato messo a punto un approccio analitico, derivato dal precedentemente citato metodo di Pelley et al. (7), che fosse preciso, accurato e praticabile in quanto eseguibile su strumentazione automatica, al fine di poter determinare l'attività della LAD nel siero per valutarne la possibile importanza dal punto di vista clinico. In particolare, è stata studiata la correlazione dei valori di LAD con altri marcatori enzimatici di origine mitocondriale, come l'isoenzima mitocondriale dell'aspartato aminotransferasi (m-AST) e la glutammato deidrogenasi (GLD), il cui significato clinico è stato più approfonditamente valutato (15-17).

## MATERIALI E METODI

### Metodi e procedure

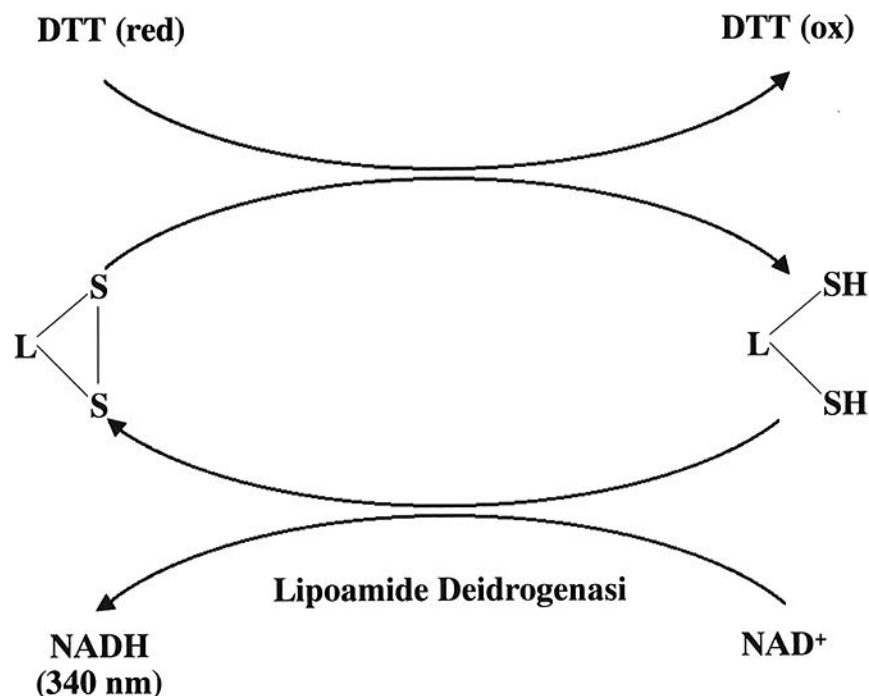
*Determinazione dell'attività catalitica della LAD con metodo manuale (7) (Figura I).* Procedura per la preparazione dei reagenti:

- Reattivo 1: aggiungere a 100 mL di tampone tricina, 50 mmol/L, pH 7.8, 3.72 mg di EDTA disodico e 199 mg di NAD<sup>+</sup> (Boehringer Mannheim GmbH). Conservare a -20°C fino al momento dell'uso.

- Reattivo 2: dissolvere 52.6 mg di DL-lipoamide (Sigma Chemical Co.) in 2.5 mL di etanolo. Aggiungere 79 mg di ditiotreitolo (Sigma Chemical Co.) e 7.5 mL di tampone tricina (pH 8.3). Incubare a 30°C per 10 min per permettere alla lipoamide di sciogliersi completamente. Dividere la soluzione in aliquote e congelare a -20°C fino al momento dell'uso.

Procedura di determinazione: le determinazioni dell'attività LAD con metodo manuale erano eseguite su uno spettrofotometro termostato Perkin Elmer, modello Lambda 2. A 1.5 mL di Reattivo 1 erano aggiunti 100  $\mu$ L di siero. La miscela era incubata per 5-10 min in modo da portare a termine le eventuali reazioni spurie dovute a possibili sostanze interferenti che potrebbero essere presenti nel campione e agire riducendo in maniera aspecifica il NAD<sup>+</sup>. Successivamente erano aggiunti 0.4 mL di Reattivo 2 e registrato l'incremento di assorbanza. Il calcolo dell'attività enzimatica in U/L era ottenuto moltiplicando la differenza di assorbanza per minuto per il fattore teorico (3175).

*Determinazione dell'attività catalitica della LAD con metodo automatico.* Procedura per la preparazione dei reagenti:



**Figura 1**

Schema della reazione impiegata nel metodo per la determinazione della lipoamide deidrogenasi. L, lipoamide; DTT, ditioneitrato

- Reattivo 1: aggiungere a 100 mL di tampone tricina, 62.5 mmol/L, pH 7.8, 4.63 mg di EDTA disodico e 248.75 mg di NAD<sup>+</sup>. Conservare la soluzione in congelatore a -20°C fino al momento dell'uso.

- Reattivo 2: dissolvere 105.2 mg di DL-lipoamide in 2.5 mL etanolo. Aggiungere 158 mg di ditioneitrato e 7.5 mL di tampone tricina (pH 8.3). Incubare a 30°C per 10 min per permettere alla lipoamide di sciogliersi completamente. Congelare fino al momento dell'uso.

Procedura di determinazione: lo strumento utilizzato per la determinazione era il Cobas Bio (Roche Diagnostics), un analizzatore centrifugo automatico con caratteristica lettura assiale della cuvetta (18). La metodica imposta sullo strumento prevede un volume di campione di 15 µL, diluente del campione di 30 µL, 120 µL di Reattivo 1 e 20 µL di Reattivo 2. Ad una incubazione di 10 min, segue l'inizio del monitoraggio della reazione enzimatica con la prima lettura dopo 10 s e successive sette letture ad un intervallo di 10 s l'una. L'attività enzimatica era calcolata in U/L moltiplicando la differenza di assorbanza per minuto per il fattore teorico (2646).

**Determinazione dell'attività dell'isoenzima m-AST.** Il metodo utilizzato si basa sull'uso di una proteasi, la proteinasi K, che inibisce in modo selettivo l'isoenzima citoplasmatico dell'AST (19). L'm-AST, che non subisce l'effetto inibitore, può essere determinato in cinetica a 340 nm con reattivo analogo a quello normalmente utilizzato per la determinazione della AST totale (20). Lo strumento impiegato per la determinazione era il Cobas Bio. L'attività enzimatica (37°C) era calcolata in U/L moltiplicando la differenza di assorbanza per minuto per il fattore teorico

(1323). Con questo metodo, l'attività sierica di m-AST presenta nei soggetti normali valori <3 U/L.

**Determinazione dell'attività della GLD.** La GLD catalizza la reazione tra α-chetoglutarato, ioni ammonio e coenzima NADH per formare glutammato, NAD<sup>+</sup> e acqua. Misurando la variazione di assorbanza del coenzima NADH nell'unità di tempo a 340 nm si calcola l'attività della GLD nel campione esaminato (21). Lo strumento impiegato per la determinazione era il Cobas Bio. L'attività enzimatica (37°C) era calcolata in U/L moltiplicando la differenza di assorbanza per minuto per il fattore teorico (992). Con questo metodo, l'attività sierica della GLD presenta un intervallo di riferimento di 0-8 U/L per i maschi e 0-5 U/L per le femmine.

### Campioni analizzati

**Valori di riferimento.** Per calcolare i limiti di riferimento della LAD nel siero umano sono stati impiegati 33 campioni ottenuti da soggetti apparentemente sani (16 maschi e 17 femmine) con un'età compresa tra i 26 e i 60 anni. Dal momento che i dati ottenuti presentavano una distribuzione asimmetrica, per il calcolo dei limiti di riferimento è stato impiegato un approccio statistico non parametrico (22).

**Pazienti con epatopatie.** Per valutare la correlazione della LAD con gli altri marcatori enzimatici di origine mitocondriale (m-AST e GLD) erano utilizzati 43 sieri di pazienti epatopatici, ottenuti dalla routine del nostro Laboratorio di Biochimica Clinica. La valutazione della correlazione era ottenuta tramite regressione lineare standard.

**Tabella 1**

Influenza della quantità di campione nella reazione per la determinazione dell'attività della lipoamide deidrogenasi (LAD) eseguita in automazione

Campione (siero), $\mu\text{L}$	Determinazioni attività enzimatica LAD, U/L				
	1 <sup>^</sup>	2 <sup>^</sup>	3 <sup>^</sup>	Media $\pm$ DS	CV,%
10	246	237	238	240 $\pm$ 5	2.1
12	237	242	245	241 $\pm$ 4	1.7
13	243	243	250	245 $\pm$ 4	1.6
14	252	247	247	249 $\pm$ 3	1.2
15	234	237	237	236 $\pm$ 2	0.7

## RISULTATI

### Ottimizzazione del metodo

**Solubilizzazione del substrato lipoamide.** Al fine di valutare la possibilità che l'etanolo impiegato per solubilizzare la lipoamide fosse contaminato con alcool deidrogenasi, è stato utilizzato isopropanolo al posto dell'etanolo per dissolvere la lipoamide, mantenendo costanti tutte le altre condizioni. Le variazioni di assorbanza ottenute sullo stesso campione erano analoghe, indipendentemente dal tipo di alcool usato. Si poteva perciò escludere che ci fossero interferenze dovute alla presenza contaminante dell'alcool deidrogenasi sul sistema ossido-riduttivo utilizzato. Di conseguenza si confermava l'utilizzo dell'etanolo per tutte le successive prove.

**Scelta della temperatura e dei tempi di monitoraggio della reazione.** Determinazioni sono state effettuate mantenendo inalterate le concentrazioni dei reattivi ma modificando la temperatura di reazione da 30°C a 37°C, essendo la reazione enzimatica piuttosto lenta da monitorare.

Non avendo evidenziato significative variazioni si è deciso di impiegare nelle prove successive la temperatura di 37°C. Tuttavia sia a 30°C che a 37°C sembravano evidenziarsi due velocità di reazione, rilevabili soprattutto con l'aumento della concentrazione dell'enzima. Impiegando una preparazione purificata dell'enzima (Sigma Chemical Co., cat. no. L 2002), ottenuta da cuore di maiale e diluita opportunamente con albumina umana 9.1% in tampone tricina pH 7.8, si poteva evidenziare che la reale velocità di reazione corrispondeva al primo tratto della cinetica enzimatica compreso tra 10 e 90 secondi dopo l'aggiunta del substrato.

**Ricerca delle condizioni ottimali per l'automazione della procedura.** Una volta verificate le condizioni preliminari suesposte, si è proceduto all'applicazione sulla strumentazione automatica della procedura. In questa fase, mentre le quantità relative ai due reagenti erano mantenute invariate, si è studiata la possibilità di aumentare il volume del campione, senza alterare la reazione enzimatica. Ciò al fine di ottenere una più elevata precisione analitica,

**Tabella 2**

Precisione del metodo automatizzato per la determinazione della lipoamide deidrogenasi

Valore medio	Imprecisione			
	nella serie		totale	
	DS	CV	DS	CV
15.6 U/L	1.89 U/L	12.1%	2.44 U/L	15.6%
34.6 U/L	2.54 U/L	7.3%	2.71 U/L	7.8%
87.3 U/L	2.68 U/L	3.1%	3.23 U/L	3.7%

**Tabella 3**

Recupero analitico

Lipoamide deidrogenasi, U/L			
Aggiunta	Osservata	Attesa	%di recupero
0	71.0	-	-
8	80.0	79.0	112.5
15	85.3	86.0	95.3
30	100.0	101.0	96.7
60	129.0	131.0	96.7
121	182.7	192.0	92.3

avendo a che fare probabilmente con attività sieriche dell'enzima normalmente basse. A questo scopo si è proceduto alle determinazioni dell'enzima modificando la quantità di siero da 10  $\mu\text{L}$  a 15  $\mu\text{L}$ , ad intervalli scalari di 1  $\mu\text{L}$ . La Tabella 1 mostra i risultati ottenuti. Come si può vedere, anche aumentando il siero del 50% (da 10 a 15  $\mu\text{L}$ ) non vi erano significative differenze nei risultati ottenuti, con tuttavia un indubbio miglioramento della precisione analitica. Sulla base di questi risultati, si è deciso quindi di impiegare nel metodo automatico una quantità di campione pari a 15  $\mu\text{L}$ .

### Valutazione del metodo automatico

**Linearità.** Il metodo automatico forniva risultati lineari fino ad almeno 310 U/L di LAD. Al fine di valutare la linearità della risposta analitica, si è proceduto alla determinazione di diluizioni scalari di un siero avente un'elevata attività di LAD. Tale siero era diluito con una soluzione di albumina umana 9.1% in tampone tricina, pH 7.8, e ogni diluizione era determinata in duplicato. L'ottima linearità della risposta ottenuta era espressa da un coefficiente di correlazione di 0.9996.

**Conservazione e stabilità dei reagenti.** Per poter determinare la stabilità dei reagenti a 0-5°C e/o a -20°C, si è proceduto alla loro preparazione secondo le modalità descritte nella sezione "Materiali e Metodi", dividendoli poi in aliquote, conservate parte in congelatore e parte in frigorifero. Con questi reattivi, a frequenza giornaliera o settimanale, era determinata in doppio l'attività enzimatica della LAD in un siero con valore elevato (231 U/L), aliquotato e congelato. I reagenti erano stabili se conservati in frigorifero per non più di 2 giorni oppure se conservati a -20°C per almeno 3 settimane.

**Precisione.** La precisione del metodo automatizzato è stata valutata mediante un esperimento eseguito secondo le raccomandazioni del "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) americano che prevede la determinazione in duplicato di tre sieri umani con differenti valori di concentrazione dell'analita studiato (normale, borderline, alta) per 20 giorni consecutivi (23). La Tabella 2 mostra i risultati ottenuti, che anche per sieri con attività di LAD normale non superavano il CV di 15%.

**Recupero.** Al fine di valutare il corretto recupero dell'enzima LAD da parte del metodo proposto, è stata determinata l'attività enzimatica in un siero a cui sono poi state aggiunte quantità scalari di enzima purificato estratto da cuore di maiale. Dopo tali aggiunte, il siero veniva testato in triplicato ed il recupero in percentuale dell'enzima calcolato come differenza tra il valore sperimentale osservato ed il valore di LAD presente nel siero originale diviso per la quantità di enzima aggiunta. I risultati evidenziavano un ottimo recupero con un valore medio pari al 98.7% (CV

8.0%) (Tabella 3).

**Interferenze.** In questo esperimento, si è proceduto all'aggiunta ad un siero con attività di LAD pari a 34 U/L di quantità adeguate delle principali sostanze potenzialmente interferenti (anticoagulanti, sostanze riducenti e interferenti endogeni). Tale campione, dopo l'aggiunta del potenziale interferente, era determinato in doppio e i risultati espressi come percentuale di recupero rispetto allo stesso siero senza le sostanze interferenti (Tabella 4). Tra le varie sostanze testate, l'unica interferenza era evidenziata con l'uso dell'EDTA come anticoagulante, la cui presenza inibiva in maniera significativa l'attività della LAD sierica.

**Correlazione con il metodo manuale.** La Figura 2 mostra la correlazione ottenuta su 23 campioni di sieri con valori di LAD compresi tra 13 U/L e 310 U/L, determinati con il metodo automatizzato proposto e, per confronto, con il metodo manuale secondo Pelley et al. (7). Come si può vedere, nonostante il relativamente piccolo numero di campioni, la correlazione era ottima, con una retta di regressione molto vicina a  $y = x$  ed un coefficiente di correlazione di 0.995.

**Valori di riferimento.** 33 soggetti apparentemente sani erano studiati al fine di ottenere i limiti di riferimento dell'attività dell'enzima LAD nel siero umano. Dal momento che la distribuzione dei valori ottenuti era asimmetrica, un approccio non parametrico era utilizzato con il calcolo dei percentili. In particolare, un valore di 19 U/L, pari a 97.5 percentile, era preliminarmente identificato come limite superiore di riferimento.

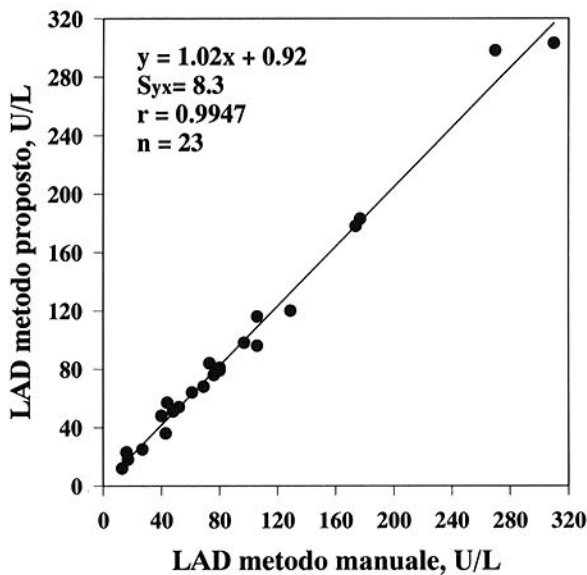
**Correlazione con altri indicatori di lesione mitocondriale.** Una preliminare valutazione dell'impiego diagnostico della determinazione della LAD sierica era ottenuta mediante la comparazione del valore dell'enzima studiato con quella di altri enzimi di origine mitocondriale, m-AST e GLD, il cui significato clinico è sicuramente più dimostrato. La correlazione era ottenuta misurando gli enzimi in 43 sieri di pazienti epatopatici con un sicuro danno epatocellulare necrotico. Dai coefficienti di determinazione ottenuti (LAD vs m-AST,  $r^2 = 0.72$ ; LAD vs GLD,  $r^2 = 0.76$ ), si ricavava un alto grado di significatività statistica ( $P < 0.001$ )

**Tabella 4**

Valutazione delle possibili interferenze nella determinazione della lipoamide deidrogenasi

Sostanza interferente	Massima concentrazione esaminata	% di recupero
Eparina	1 g/l	94.1%
Citrato	20 mmol/L	98.5%
EDTA K <sub>3</sub>	2.5 mmol/L	64.7%*
Fluoruro	50 mmol/L	97.1%
Creatinina	4.5 mmol/L	92.4%
Glucosio	55 mmol/L	103.2%
Acido urico	1.8 mmol/L	102.9%
Acido ascorbico	140 mmol/L	94.1%
Trigliceridi	500 mg/dL	106.3%
Emoglobina	0.25 g/dL	97.0%
Bilirubina	10 mg/dL	92.3%

\*Interferenza significativa ( $P < 0.001$ )



**Figura II**  
Correlazione tra metodo manuale di Pelley et al. e metodo proposto per la determinazione della lipoamide deidrogenasi (LAD) nel siero

nella interdipendenza tra i diversi marcatori enzimatici, indicando che essi probabilmente esprimono un'informazione diagnostica parzialmente univoca e, d'altro canto, avvalorando l'ipotesi che il valore della LAD nel siero possa riflettere in maniera sufficientemente accurata la presenza di un significativo danno tissutale.

## DISCUSSIONE

Il presupposto di questo lavoro è stato quello di mettere a punto una procedura sufficientemente affidabile che consentisse di valutare eventuali aumenti dell'attività dell'enzima LAD in pazienti con significativi danni tissutali. Ciò spiega la scelta di utilizzare come base di lavoro il metodo proposto da Pelley et al. (7), in quanto questi autori sono stati finora gli unici a proporre la valutazione della LAD nel siero a fini diagnostici in corso di epatopatie o danni al miocardio. Dopo aver verificato che le condizioni suggerite da Pelley fossero riproducibili, il principale obiettivo è stato quello di adattare tale metodica ad uno strumento automatico, al fine di permetterne un'eventuale applicazione a livello clinico-diagnostico. Infatti ciò non sarebbe stato possibile disponendo solamente di un metodo manuale con tempi di esecuzione prolungati e tutte le operatività ripetute per ogni singolo campione. Mentre, infatti, nella metodica originaria l'esecuzione di un singolo test richiedeva circa 15 min, con il metodo automatizzato proposto si possono ottenere circa 25 risultati in uno stesso periodo di tempo.

I risultati della valutazione del metodo qui riportati consentono di affermare che l'obiettivo di ottenere un

metodo veloce e affidabile è stato pienamente raggiunto. La linearità della risposta è infatti molto buona, come anche ottimi sono il recupero e la precisione ottenuta nella serie e tra le serie. È stato inoltre dimostrato come il metodo in esame non presenti significative interferenze, se non da parte di un solo tipo di anticoagulante (EDTA). Ad ulteriore conferma della bontà della scelta effettuata, il confronto dei valori della LAD ottenuti con tale metodo con altri parametri enzimatici indicativi di lesione mitocondriale (m-AST e GLD) ha dato risultati estremamente soddisfacenti, mostrando indici di correlazione molto alti.

Alla luce di queste considerazioni, si può concludere che l'aumento dell'enzima LAD nel siero, evidenziato con la metodica qui proposta, può realmente rispecchiare una significativa sofferenza cellulare e che quindi questo metodo può fornire una buona base analitica per permettere di estendere le conoscenze sul valore clinico degli aumenti della LAD sierica.

## BIBLIOGRAFIA

- Williams CH. Lipoamide dehydrogenase. In: Boyer PD, ed. *The Enzymes*. New York: Academic Press 1979;13:106-29.
- Otulakowski G, Robinson BM. Isolation and sequence determination of cDNA clones for porcine and human lipoamide dehydrogenase. *J Biol Chem* 1987;262:17313-8.
- Lusty CJ, Singer TP. Lipoyl dehydrogenase - Free and complexed forms in mammalian mitochondria. *J Biol Chem* 1964;239:3733-42.
- Cohn ML, McManus IR. Studies on the distribution and properties of the multiple forms of mammalian lipoamide dehydrogenase. *Biochem Biophys Acta* 1972;276:70-84.
- Kenney WC, Zakim D, Hogue PK, Singer TP. Multiplicity and origin of isoenzymes of lipoyl dehydrogenase. *Eur J Biochem* 1972;28:253-60.
- Carothers DJ, Raefsky-Estrin C, Pons G, Patel MS. Rat liver mitochondria contain two immunologically distinct dihydrolipoamide dehydrogenases. *Arch Biochem Biophys* 1987; 256:597-605.
- Pelley JW, Little GH, Linn TC, Hall FF. Lipoamide dehydrogenase in serum: A preliminary report. *Clin Chem* 1976;22:275-7.
- Filla A, Butterworth RF, Geoffroy B, Lemieux B, Barbeau A. Serum and platelet lipoamide dehydrogenase in Friedreich's Ataxia. *Can J Neurol Sci* 1978;5:111-4.
- Becker DM, Knipprath WG, Perlman S, Nissenson C, Kark P. Optimal conditions for the assay of lipoamide dehydrogenase in homogenized human platelets. *Clin Chim Acta* 1982;121:1-9.
- Seet AM, Lee KT. A colorimetric method for the assay of lipoyl dehydrogenase. *Mikrochim Acta* 1975;5/6:577-83.
- Seet AM, Lee KT. Determination and properties of erythrocyte lipoyl dehydrogenase. *Mikrochim Acta* 1975;4/5:407-12.
- Berger I, Elpeleg ON, Saada A. Lipoamide dehydrogenase activity in lymphocytes. *Clin Chim Acta* 1996;256:197-201.
- Ide S, Hayakawa T, Okabe K, Koike M. Lipoamide dehydrogenase from human liver. *J Biol Chem* 1967;242:54-60.
- Stumpf DA, Parks JK. Friedreich ataxia. II. Normal kinetics of lipoamide dehydrogenase. *Neurology* 1979;29:820-6.
- Schmidt FW, Schmidt E. Diagnostic application of mitochondrial enzymes and isoenzymes. *Clin Chim Acta* 1989;185:253-64.

16. Panteghini M. Aspartate aminotransferase isoenzymes. *Clin Biochem* 1990;23:311-9.
17. Schmidt E, Schmidt FW. Glutamate dehydrogenase: biochemical and clinical aspects of an interesting enzyme. *Clin Chim Acta* 1988;43:43-56.
18. Eisenwiener HG, Keller M. Absorbance measurement in cuvettes lying longitudinal to the light beam. *Clin Chem* 1979;25:117-21.
19. Panteghini M, Bonora R, Pagani F. Selective measurement of mitochondrial aspartate aminotransferase in serum with use of proteinase K. *Giorn It Chim Clin* 1993;18:85-90.
20. Panteghini M, Bonora R, Pagani F. Automated measurement of mitochondrial aspartate aminotransferase by selective proteolysis with proteinase K. *Clin Chem* 1993;39:2199-200.
21. Schmidt E, Henkel E, Klanke R, et al. Proposal of standard routine methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37° C. Glutamate dehydrogenase. *Biochim Clin* 1990;14:1370.
22. Solberg HE. IFCC approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:645-56.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices: approved guideline EP5-A. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.