

BASI DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO · LEZIONE 2 DI 5

Fondamenti di diagnostica enzimatica

Contesti diagnostici, matrici biologiche, unità di attività catalitica e condizioni del dosaggio enzimatico

Contenuti

I	Richiamo da Lezione 01	5 min
II	Contesti diagnostici del dosaggio enzimatico	15 min
III	Matrici biologiche	10 min
IV	Unità di misura dell'attività catalitica	15 min
V	Condizioni tecniche del dosaggio	25 min
VI	Perché e come un enzima arriva nel sangue	20 min

SEZIONE PRIMA · 5 MINUTI

Richiamo da Lezione 1

Tre concetti che oggi diamo per acquisiti.

I · RICHIAMO

Da dove riprendiamo

- 01 L'enzima abbassa $\Delta G^\ddagger$ (energia di attivazione), non altera ΔG : agisce sulla cinetica, non sulla termodinamica
- 02 A substrato saturante la velocità raggiunge $V_{\max}$ e dipende solo dalla concentrazione di enzima — il principio che oggi diventa un metodo di dosaggio
- 03 L'enzima è un processore di informazione: da oggi, la sua presenza fuori sede è essa stessa un'informazione clinica

SEZIONE SECONDA · 15 MINUTI

Contesti diagnostici del dosaggio dosaggio enzimatico

Perché doso un enzima: per scoprire una malattia, per seguirne il decorso, o per valutarne la gravità.

Perché si dosano gli enzimi: tre valori

Valore diagnostico

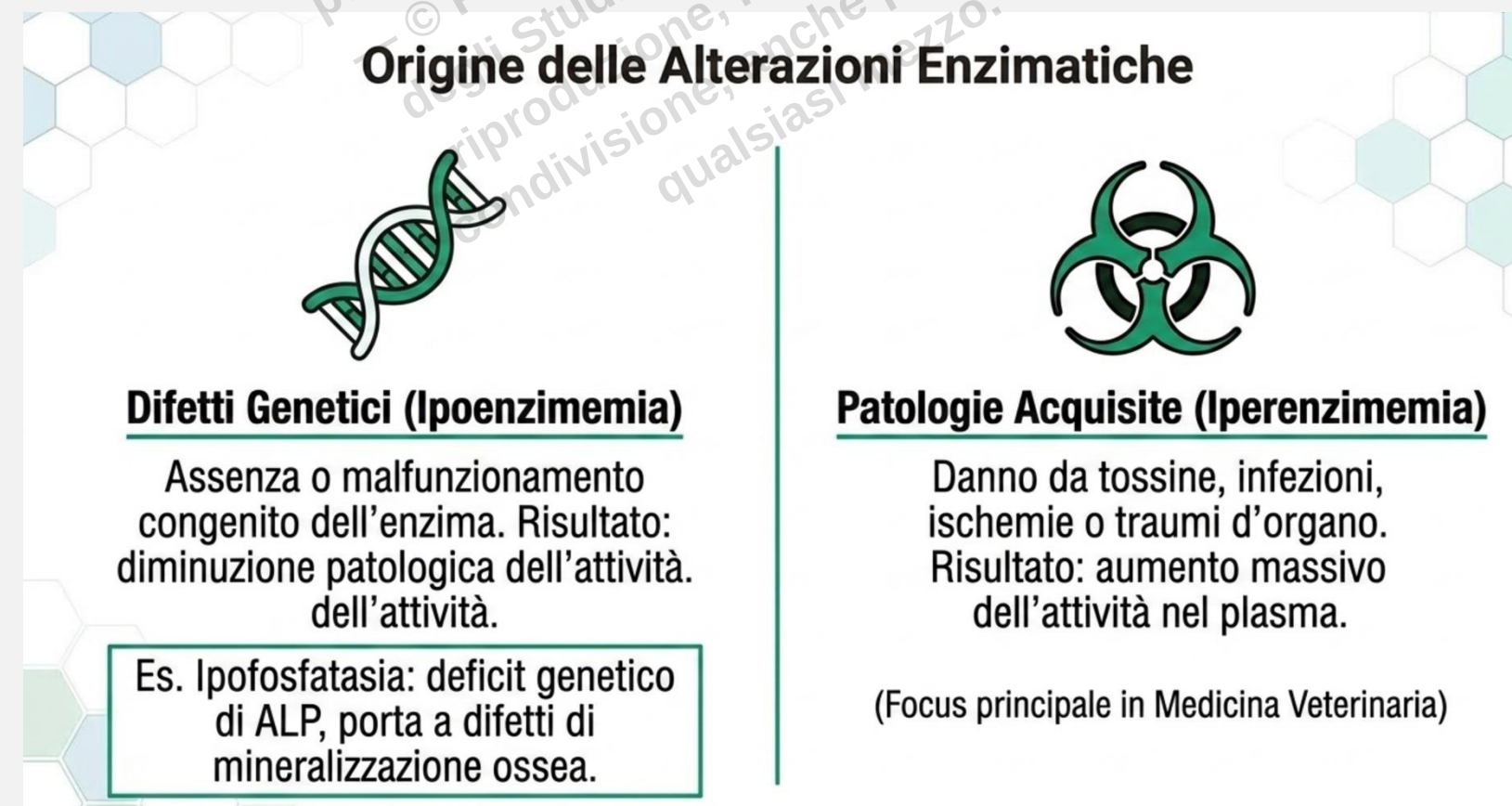
Identifica se c'è un problema e *dove* — quale organo o tessuto è coinvolto

Valore dinamico

Segue l'evoluzione temporale dell'evento: inizio, picco, declino

Valore prognostico

Correla l'entità dell'aumento con la *gravità* del danno



Malattie genetiche: deficit enzimatici congeniti

Ridotta espressione o ridotta attività di un enzima specifico: il segno di laboratorio è un *difetto*, non un eccesso.

Fenilchetonuria

Deficit di fenilalanina idrossilasi: si dosa il metabolita accumulato, non l'enzima stesso.

Glicogenosi

Difetti degli enzimi del metabolismo del glicogeno, con accumulo tissutale a valle del blocco.

Ipofosfatasia

Attività della fosfatasi alcalina stabilmente bassa: qui il valore *ridotto* è il reperto diagnostico.

II · CONTESTI DIAGNOSTICI

Danno tissutale acquisito

Condizione di gran lunga più frequente: un tessuto normalmente ricco di un dato enzima subisce un insulto — traumatico, ipossico, tossico, infettivo, neoplastico — e libera l'enzima in circolo.

Qui il valore *aumentato* è il reperto diagnostico — l'opposto del caso genetico.

Valore diagnostico e dinamico

Sede della lesione

La combinazione di enzimi elevati orienta verso l'organo o il tessuto coinvolto — tema che approfondiremo da Lezione 4.

Evoluzione temporale

Inizio, picco e declino dell'attività enzimatica descrivono la fase dell'evento e la risposta al trattamento.

Una determinazione isolata ha valore limitato: è la *serie temporale* l'informazione clinica completa.

Valore prognostico e interpretazione dei pattern

Entità dell'aumento

Correla, in generale, con la massa di tessuto danneggiata o con l'aggressività di un processo neoplastico.

Pattern combinati

Il rapporto fra più enzimi orienta meglio della lettura isolata di un singolo valore — principio che ritroveremo in ogni lezione successiva.

SEZIONE TERZA · 10 MINUTI

Matrici biologiche

Dove si dosano gli enzimi, e perché la scelta del campione conta.



Matrici biologiche di dosaggio

Siero

Matrice di elezione: assenza di anticoagulanti interferenti e di fibrinogeno.

Plasma

Necessario per gli enzimi della coagulazione; l'anticoagulante va scelto in funzione dei cofattori richiesti.

Urine e saliva

Enzimi a basso peso molecolare filtrati dal glomerulo, o secreti localmente: indicatori mirati, uso più limitato.

Liquidi di versamento

Essudati, liquido pleurico e ascitico: la LDH concorre alla distinzione essudato/trasudato.



Interferenze pre-analitiche della matrice

Emolisi

Gli eritrociti sono ricchi di LDH e AST: la lisi in vitro genera un falso aumento non legato a patologia.

Anticoagulanti chelanti

L'EDTA sequestra i cationi bivalenti e sottostima l'attività di enzimi che li richiedono come cofattori.

Prima di interpretare un aumento occorre sempre escludere che sia stato generato dal campione, non dal paziente.

SEZIONE QUARTA · 15 MINUTI

Unità di misura dell'attività catalitica

Non si dosa una massa proteica: si misura una velocità di reazione in condizioni definite.

Unità Internazionale e katal

Unità Internazionale (U, UI)

Quantità di enzima che converte 1 μmole di substrato *al minuto*, in condizioni standard di pH, temperatura e saturazione.

Katal (kat)

Unità del Sistema Internazionale: quantità di enzima che converte 1 *mole* di substrato *al secondo*.

$$1 \text{ U} = 1,67 \times 10^{-8} \text{ kat}$$

Il katal genera valori poco maneggevoli: la refertazione clinica resta in UI/L e sottomultipli.

IV · UNITÀ

Espressione clinica del risultato

L'attività si riporta per unità di volume — UI/L di siero o plasma — e si legge sempre contro l'intervallo di riferimento specifico del metodo utilizzato.

Valori ottenuti con metodi, substrati o temperature diverse non sono direttamente confrontabili tra loro.

IV · UNITÀ

Il referto: un caso reale

Amilasi 1451 UI/L su un intervallo di riferimento di 60-180 UI/L, con lipasi nella norma.

Il numero da solo non basta: conta sempre insieme all'intervallo di riferimento e agli altri enzimi del pannello.

Table 2. Complementary exams.

Indicators	Patient	Reference
Total bilirubin (mg/dL)	0.83	0.3-1.0
Direct bilirubin (mg/dL)	0.58	0-0.3
Indirect bilirubin (mg/dL)	1.25	0.2-0.7
Albumin (g/dL)	4.9	3.5-5.5
AST (U/L)	36	0-38
ALT (U/L)	46	0-41
Gama GT (U/L)	224	11-50
Alkaline phosphatase(U/L)	87	21-85
Total cholesterol (mg/dL)	246	0-200
HDL cholesterol (mg/dL)	90	35 or greater
Triglycerides (mg/dL)	65	0-150
Amylase (U/L)	1451	60-180
Lipase (U/L)	19	0-160
Alpha-fetoprotein 1 (ng/mL)	49	0-15
CA 19-9 (U/mL)	Less than 2.5	0-30
T3 (ng/mL)	122	60-181
T4 (µg/mL)	10.2	4.5-10.9
TSH (µU/mL)	1.949	0.5-4.7

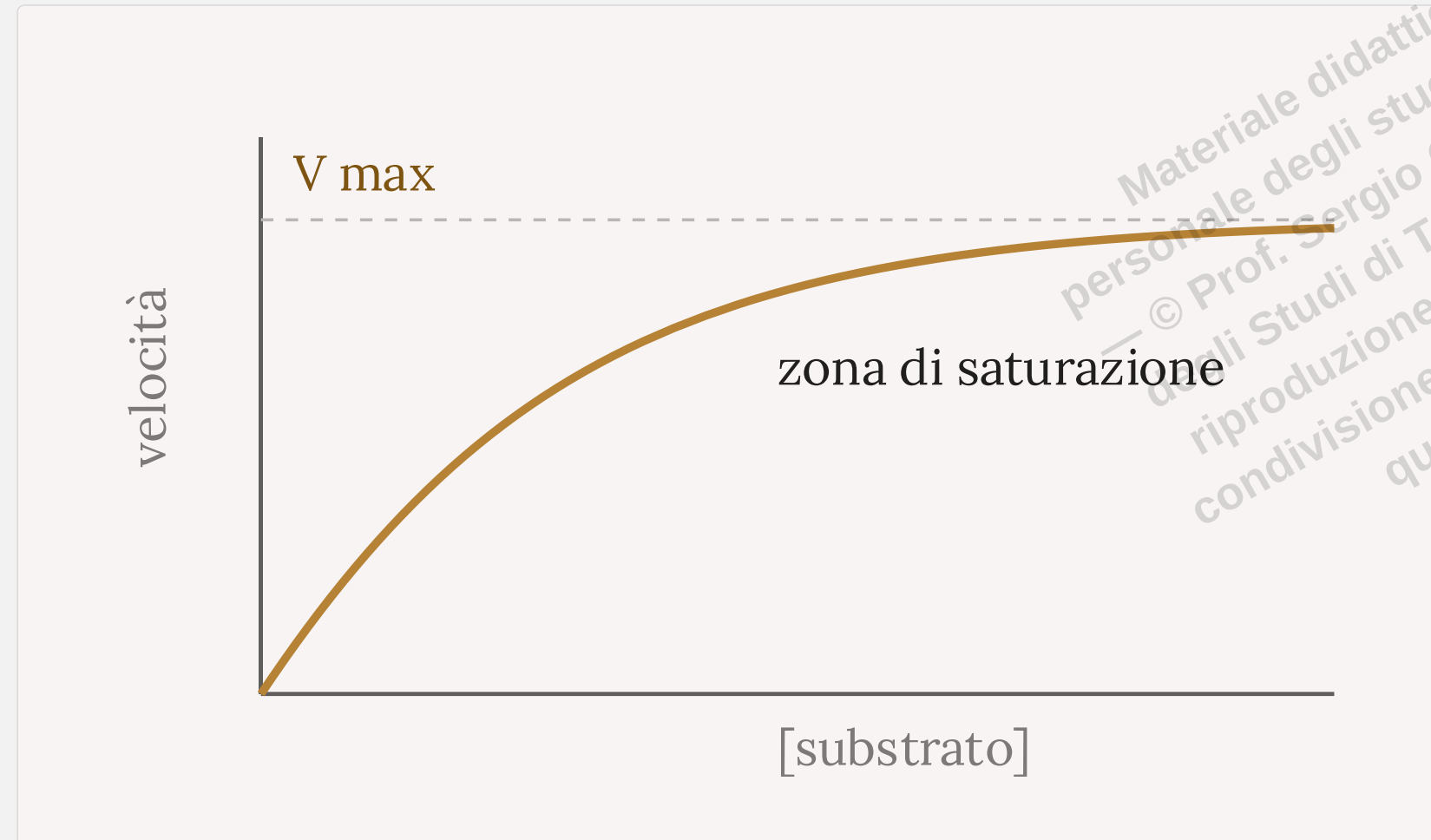
SEZIONE QUINTA · 25 MINUTI

Condizioni tecniche del dosaggio

Perché la velocità misurata rifletta la concentrazione dell'enzima e non altro.



Substrato saturante e velocità massima



Con substrato in largo eccesso la velocità dipende solo dalla quantità di enzima presente: *cinetica di ordine zero*.

Fuori dal plateau il dosaggio misura la disponibilità di substrato, non l'enzima.

Eccessi troppo spinti possono generare *inibizione da substrato*: la concentrazione va scelta, non massimizzata.

pH ottimale di reazione

ENZIMA

AMBIENTE OTTIMALE

RILIEVO ANALITICO

Fosfatasi alcalina (ALP)

basico

Tampone alcalino: esclude di fatto la forma acida

Lattato deidrogenasi (LDH)

neutro

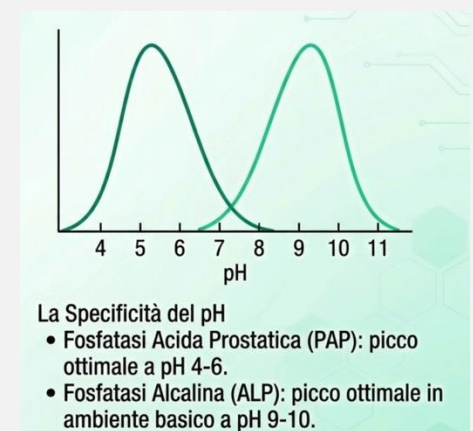
Direzione della reazione scelta in base al pH del saggio

Fosfatasi acida (ACP)

acido

Base del dosaggio della forma prostatica

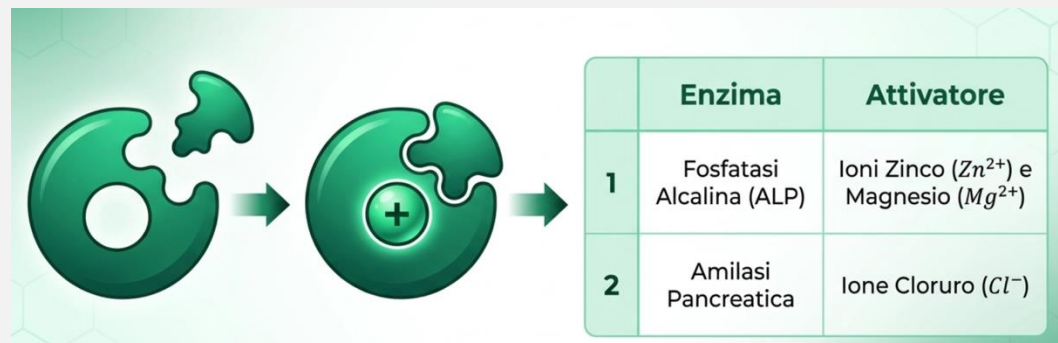
Temperatura costante e controllata (tipicamente 37 °C) è parte integrante della definizione dell'unità, non un optional.



Cofattori e ioni metallici

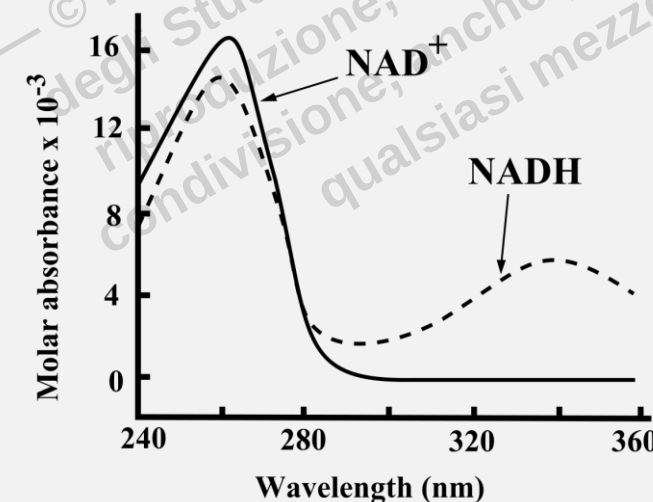
Metalloenzimi

La fosfatasi alcalina richiede zinco per la struttura catalitica e magnesio come attivatore — esempio guida della categoria.



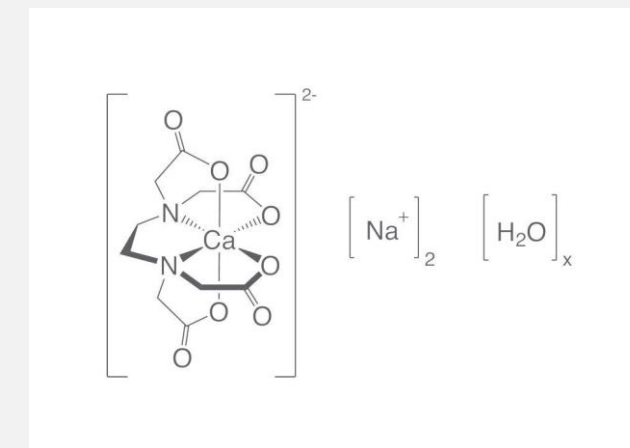
Coenzimi

Piridossalfosfato per le transaminasi, NAD^+ / $NADH$ per le deidrogenasi: vanno forniti in eccesso nel saggio.



Interferenze

Chelanti come l'EDTA sottraggono i cationi bivalenti e producono una sottostima dell'attività.



La scelta della provetta fa parte del metodo: l'anticoagulante ammesso è definito insieme al saggio, non lasciato al caso.

V · CONDIZIONI

La specificità come vantaggio analitico

Un reagente chimico generico reagisce con intere classi di molecole. Un enzima riconosce *un* substrato specifico — questo permette di quantificare una singola sostanza in una matrice complessa come il siero, senza doverla prima separare dal resto.

È lo stesso principio che rende gli enzimi, oltre che analiti, anche eccellenti *reagenti* diagnostici.

V · CONDIZIONI

Cenno alle tecniche di misura

Una volta garantite queste condizioni, la velocità di reazione si misura più spesso per via **spettrofotometrica**, seguendo nel tempo l'assorbanza di un prodotto o reagente colorato.

Il principio fisico (legge di Lambert-Beer) e la sua declinazione elettroforetica per gli isoenzimi sono il punto di partenza di Lezione 03.

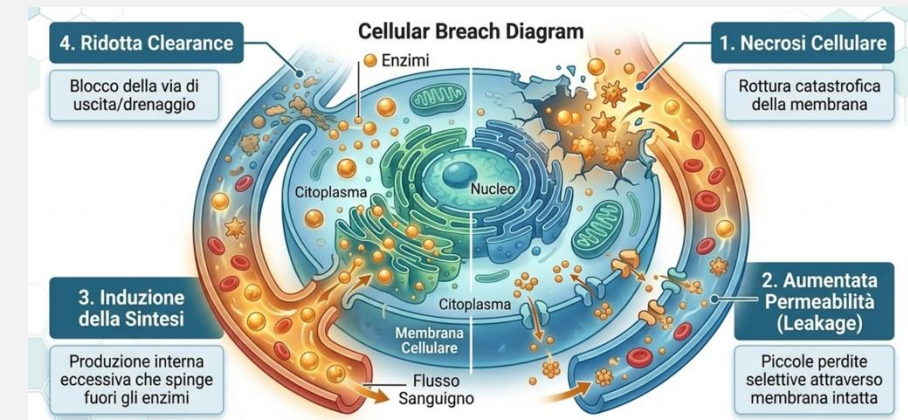
SEZIONE SESTA · 20 MINUTI

Perché e come un enzima arriva nel sangue

L'equilibrio dinamico tra rilascio e clearance che ogni valore plasmatico riflette.

Meccanismi di iperenzimemia

- | | | |
|-----------|--------------------------------|--|
| 01 | Necrosi cellulare | Perdita di integrità della membrana: rilascio massivo, anche di enzimi mitocondriali |
| <hr/> | | |
| 02 | Aumentata permeabilità | Danno reversibile da ipossia o variazioni di pH: escono i soli enzimi citosolici |
| <hr/> | | |
| 03 | Induzione della sintesi | Sovraespressione genica indotta da alcol o farmaci: tipico della GGT e della ALP |
| <hr/> | | |
| 04 | Ridotta clearance | Rallentata rimozione renale o reticolo-endoteliale a produzione invariata |



Classificazione funzionale degli enzimi plasmatici

Plasma-specifici (funzionali)

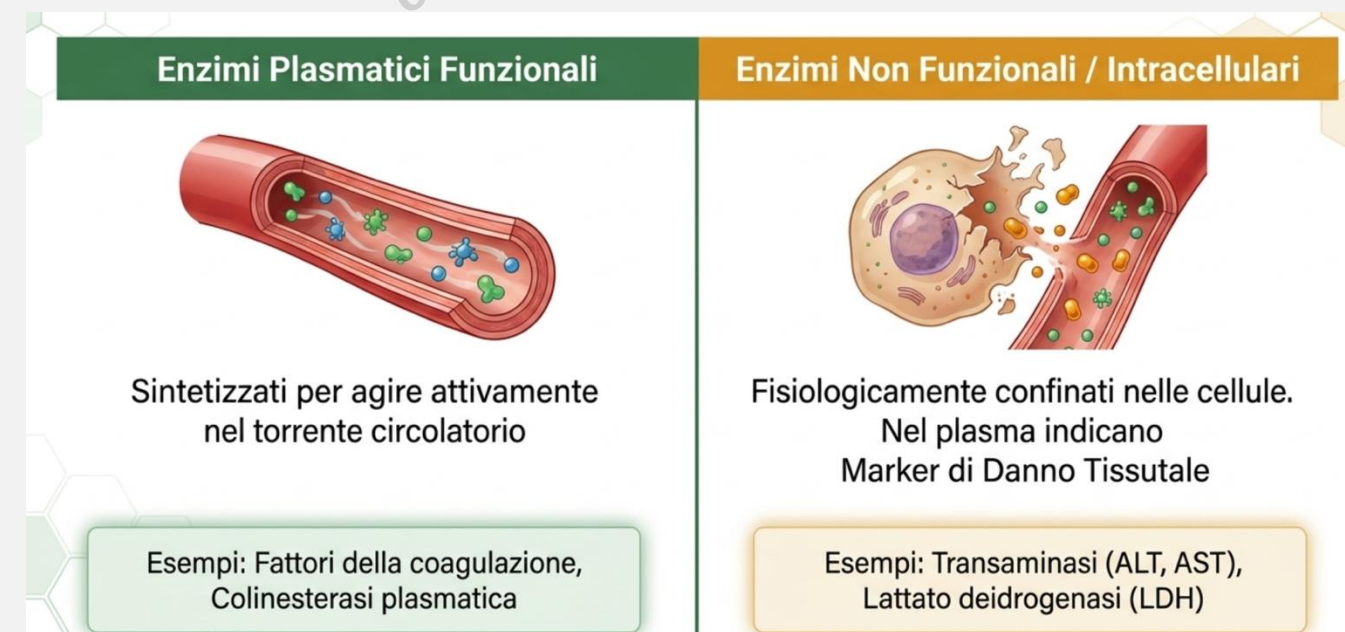
Svolgono la loro funzione fisiologica direttamente nel sangue: fattori della coagulazione, pseudocolinesterasi.

Una loro diminuzione indica spesso un deficit di sintesi, non un danno tissutale diretto.

Non plasmatici (intracellulari)

Normalmente confinati nelle cellule, con concentrazione plasmatica basale minima: LDH, CK, transaminasi.

Un loro aumento è indice di sofferenza o danno cellulare.



Emivita e finestra diagnostica

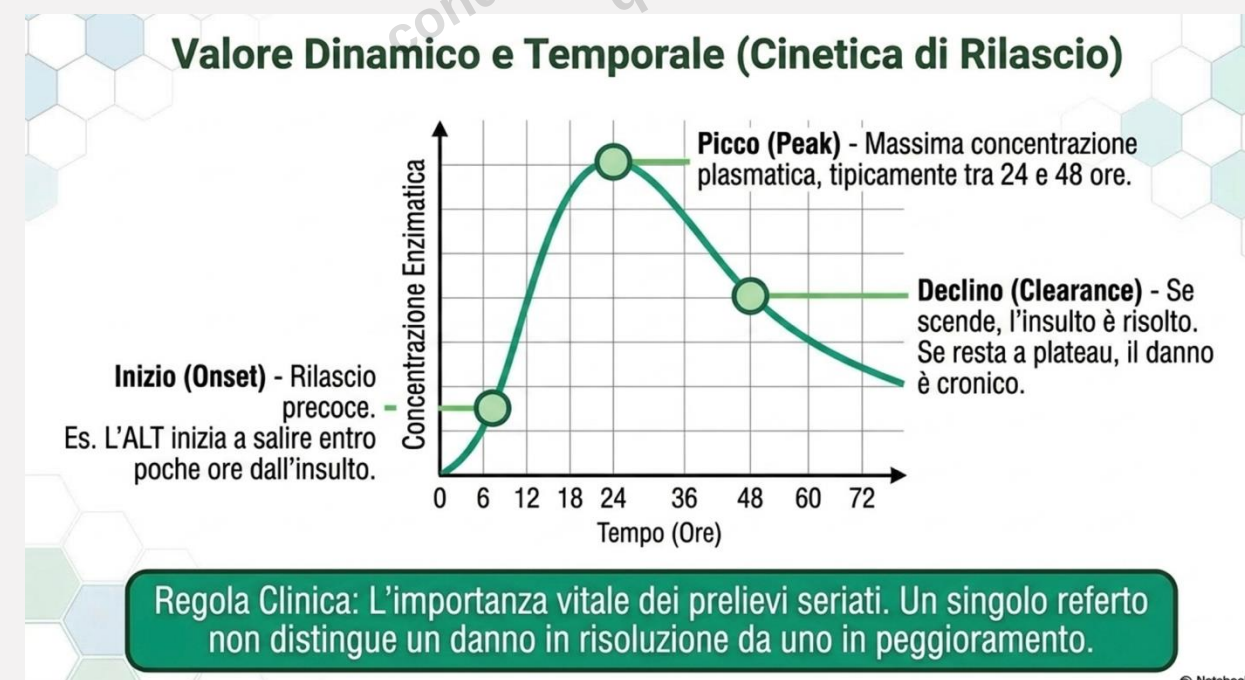
Il valore plasmatico osservato riflette un **equilibrio dinamico** fra velocità di rilascio dalle cellule e velocità di eliminazione (*clearance*).

Emivita breve

Scompare rapidamente dopo l'insulto: utile per monitorare un cambiamento acuto, ma facile da perdere se il prelievo è tardivo.

Emivita lunga

Resta elevata per giorni: facilita la diagnosi tardiva, ma rende difficile cogliere un miglioramento recente.



Localizzazione subcellulare e profondità del danno

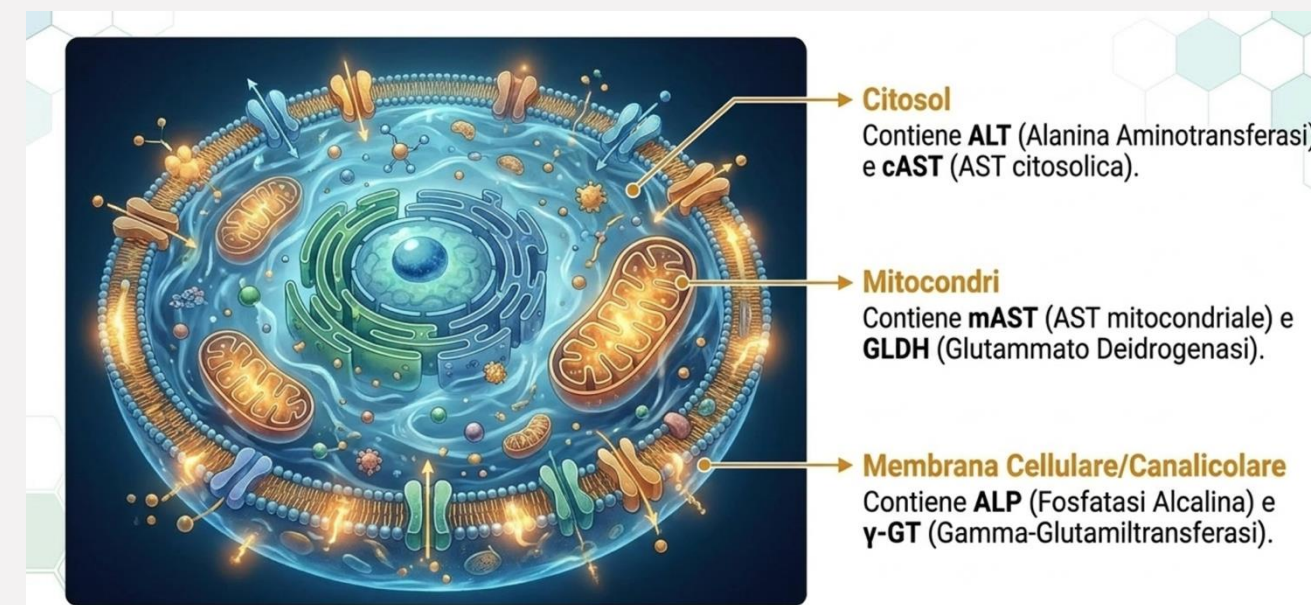
Enzimi citosolici

Liberamente disciolti nel citoplasma: rilasciati anche da una semplice alterazione della permeabilità di membrana.

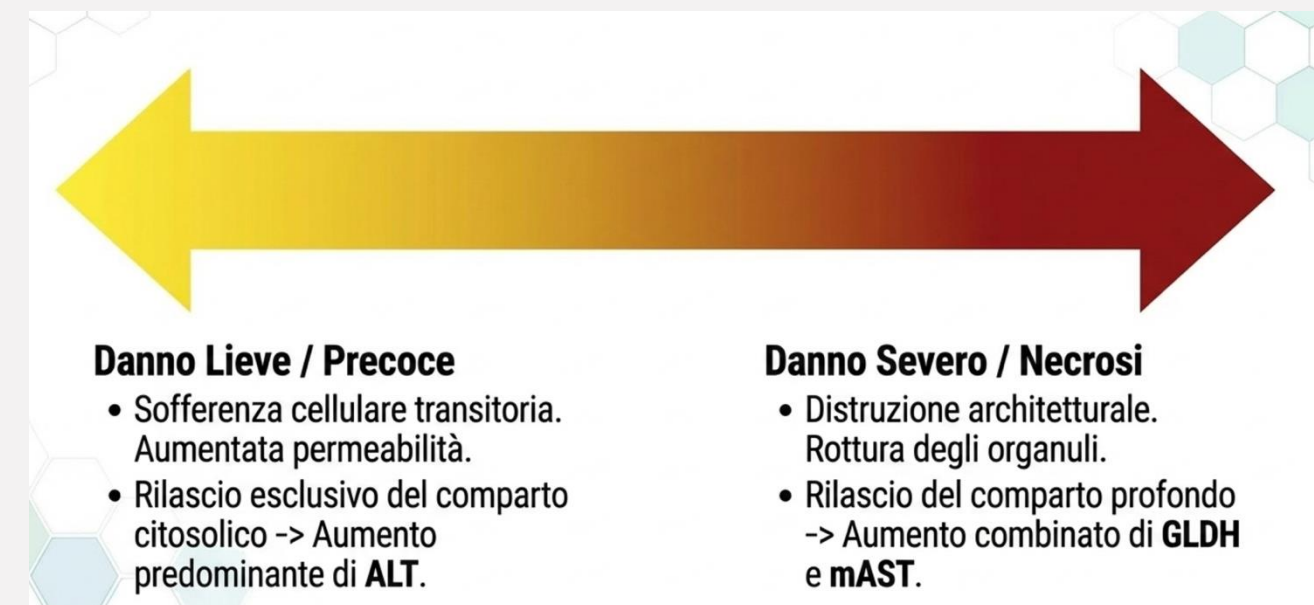
Enzimi mitocondriali

Confinati in un organello: il rilascio richiede la rottura sia della membrana plasmatica che di quella mitocondriale.

Danno lieve o precoce



Necrosi profonda e irreversibile



VI · NEL SANGUE

Verso Lezione 3

Sappiamo ora perché doseremo un enzima, in cosa, con quale unità e a quali condizioni. Manca un pezzo: la stessa attività enzimatica totale può nascondere **forme molecolari diverse**, con origine tissutale diversa.

| Spettrofotometria, isoenzimi e la loro discriminazione: è il contenuto di Lezione 3.

SINTESI

Punti chiave

- 01** Malattie genetiche vs danno acquisito: un difetto enzimatico e un eccesso enzimatico raccontano storie opposte.
- 02** Si misura una velocità, non una massa: le condizioni del saggio fanno parte del risultato.
- 03** Il valore plasmatico è un equilibrio dinamico tra rilascio e clearance, non uno scatto istantaneo.
- 04** L'origine subcellulare dell'enzima gradua la profondità del danno tissutale — approfondiamo da qui la prossima lezione.