

BASI DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO · LEZIONE 3 DI 5

Spettrofotometria e isoenzimi

Come si misura davvero un'attività enzimatica, e come una stessa attività può nascondere forme molecolari diverse

Contenuti

I	Tecniche di misura dell'attività enzimatica	20 min
II	Isoenzimi: fondamenti e discriminazione	20 min
III–IV IV	Origine nel sangue e compartimentazione	10 min
V	Paradigmi isoenzimatici: LDH e CK	20 min
VI	Valori di riferimento: principi generali	20 min

SEZIONE PRIMA · 20 MINUTI

Tecniche di misura dell'attività enzimatica

Dal principio fisico allo strumento, dallo strumento al numero sul referto.

I · TECNICHE

Non si pesa, si misura una velocità

In Lezione 2 abbiamo stabilito il principio: l'attività catalitica si misura seguendo la velocità di trasformazione del substrato, in condizioni controllate. La tecnica di gran lunga più diffusa per farlo è la **spettrofotometria**.

Si segue nel tempo l'assorbimento di luce di un prodotto o un reagente colorato.

La legge di Lambert-Beer

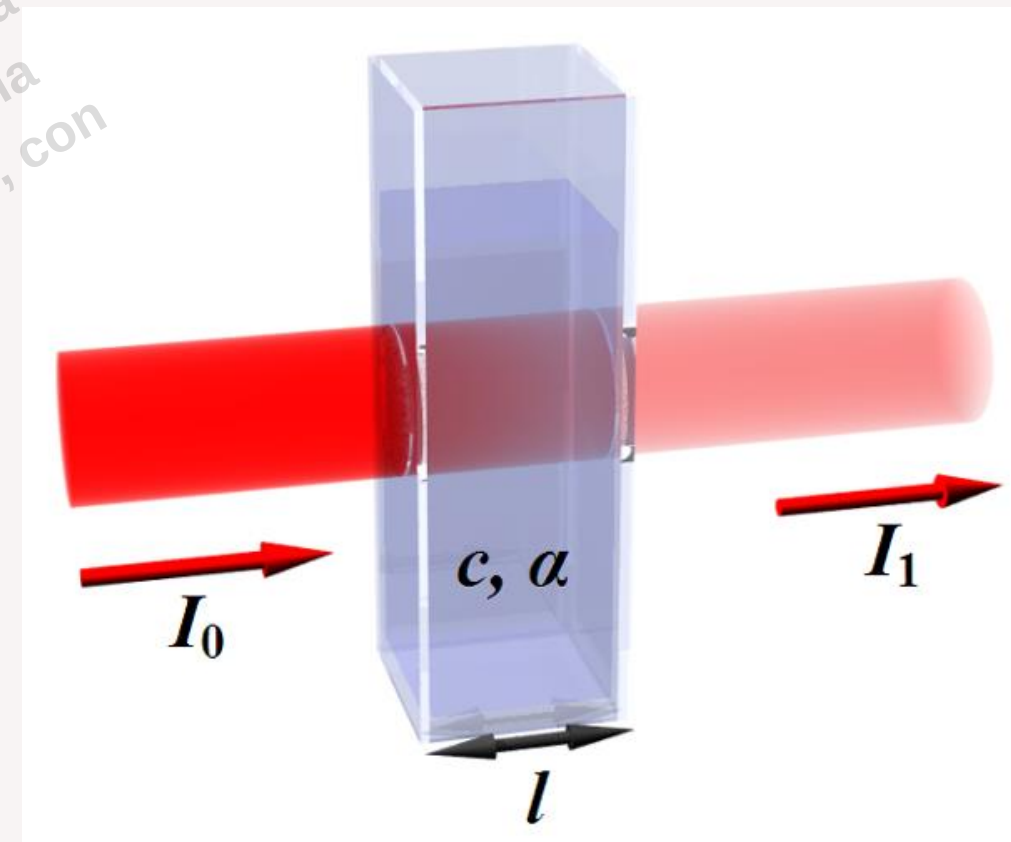
$$A = \varepsilon \cdot d \cdot C$$

A — assorbanza, grandezza adimensionale

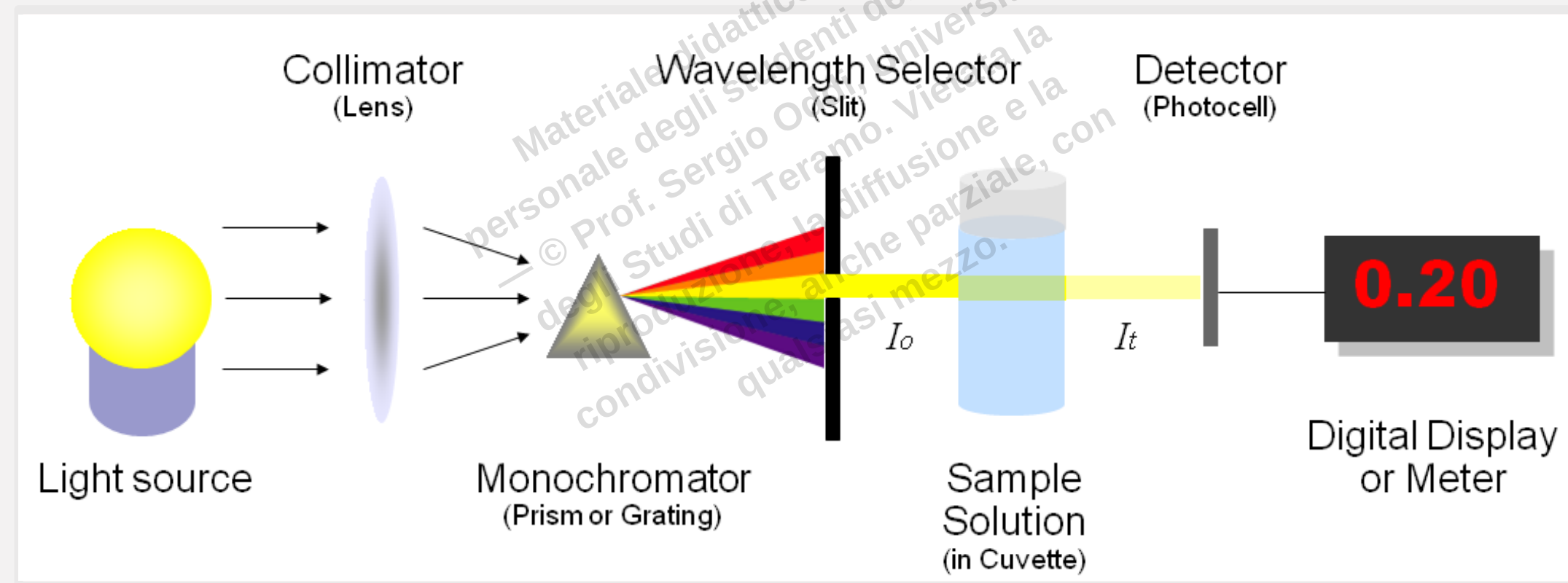
ε — coefficiente di estinzione molare ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), specifico della sostanza

d — cammino ottico, di norma 1 cm

C — concentrazione del cromoforo (mM)



Anatomia dello spettrofotometro



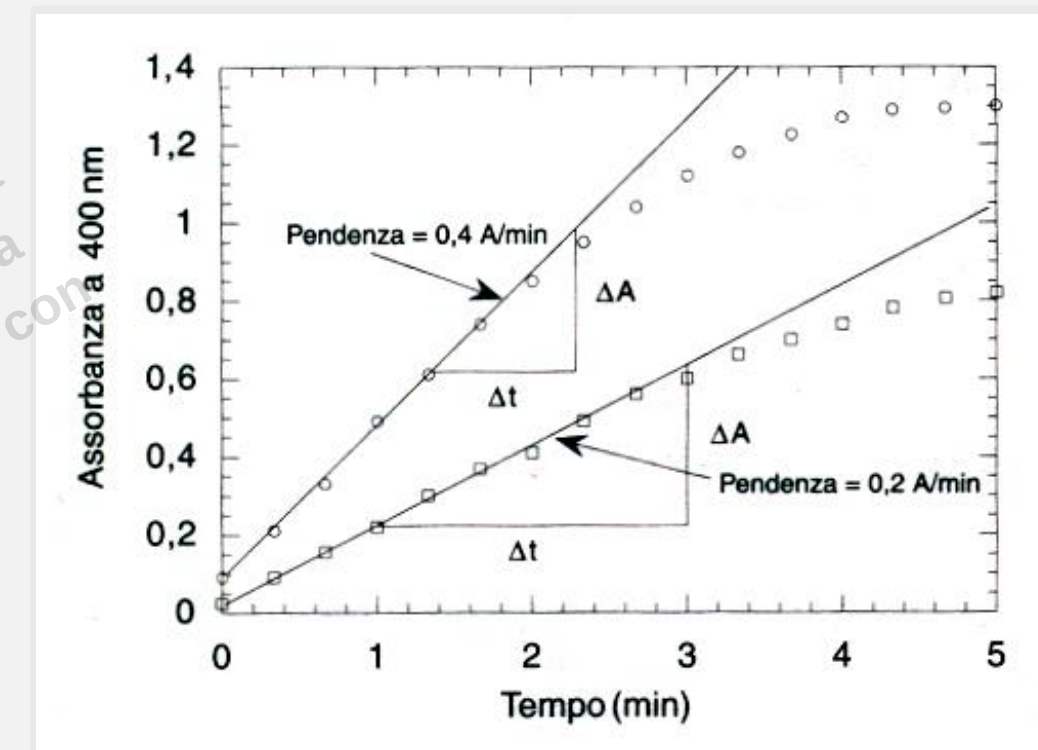
Sorgente → monocromatore (seleziona la lunghezza d'onda) → cuvetta col campione → rivelatore → lettura digitale dell'assorbanza.

I · TECNICHE

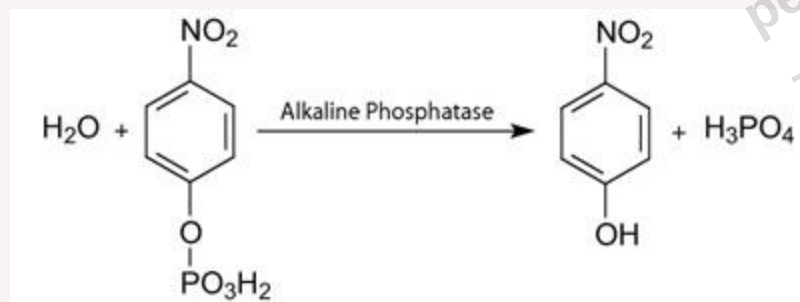
Dalla curva alla velocità iniziale

Il parametro clinico è la **velocità iniziale (V_0)**: la pendenza della fase lineare del grafico assorbanza-tempo, $\Delta A / \Delta t$.

Più enzima nel campione, più rapido l'accumulo di prodotto colorato: pendenza maggiore.



Caso applicato: il saggio della fosfatasi alcalina



Il p-nitrofenilfosfato (PNPP), incolore, viene idrolizzato in p-nitrofenolo (PNP), giallo a pH alcalino: assorbimento massimo a 405 nm.

$$V_0 = (\Delta A / \Delta t) \cdot 0,05316$$

Il fattore 0,05316 è $1/(\epsilon \cdot d)$: converte la pendenza in mM di prodotto al minuto.

I · TECNICHE

Standardizzazione: perché il metodo conta

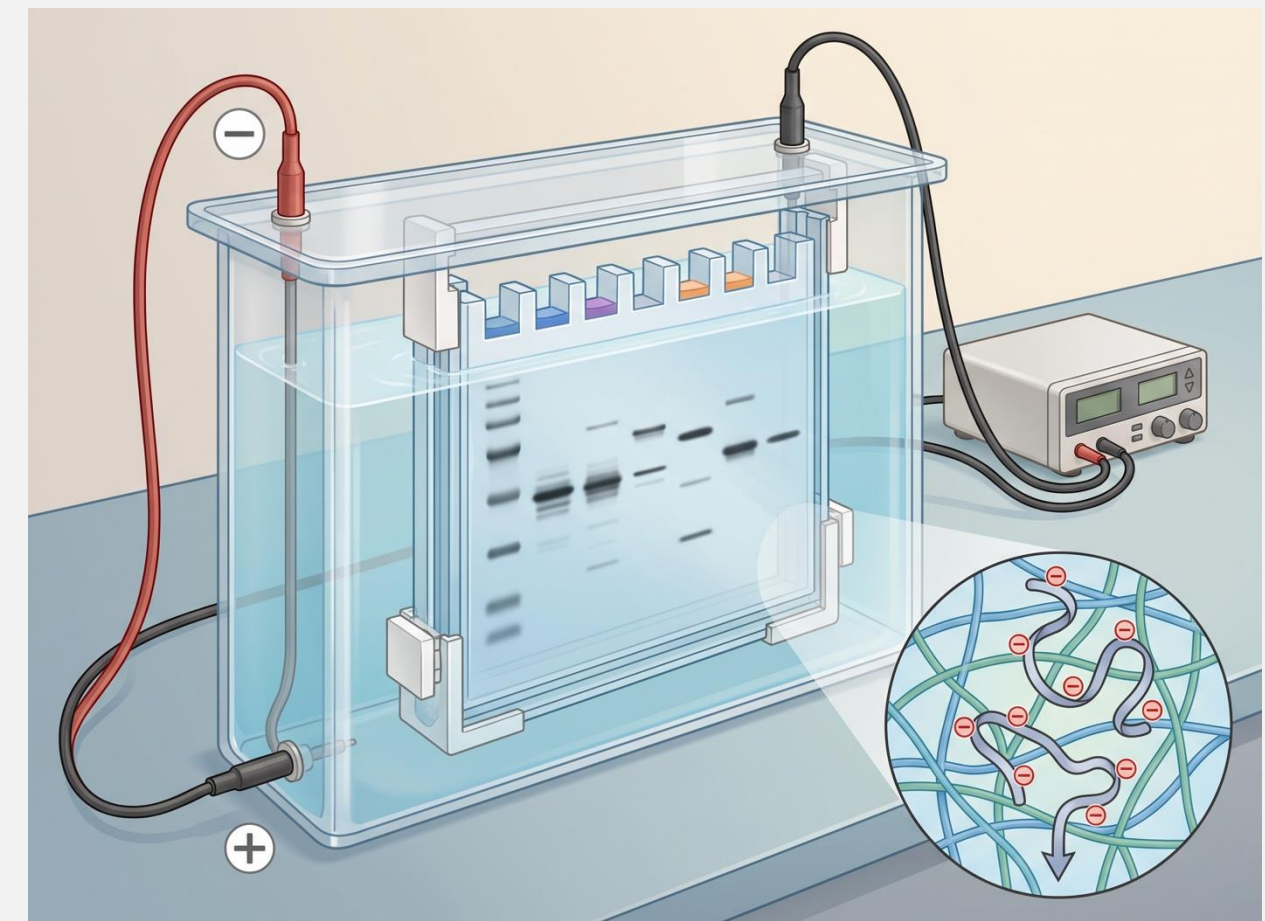
Substrato, tampone, pH e temperatura definiscono insieme il metodo, non solo le sue condizioni accessorie. Risultati ottenuti con metodi diversi — anche per lo stesso enzima — non sono direttamente confrontabili.

La temperatura di reazione, in particolare, va sempre standardizzata a 37 °C — vi torniamo in sezione VI.

Elettroforesi: cenni

La spettrofotometria misura l'attività *totale* di un enzima nel campione. Quando i metodi chimici non bastano a distinguere le sue forme molecolari, l'**elettroforesi** le separa sfruttando la loro diversa mobilità in un campo elettrico.

Quelle forme molecolari diverse sono gli isoenzimi — il tema della prossima sezione.



SEZIONE SECONDA · 20 MINUTI

Isoenzimi: fondamenti e discriminazione

Come una stessa reazione può essere catalizzata da molecole diverse, e come distinguerle.

Cosa sono gli isoenzimi

Forme multiple di uno stesso enzima, che catalizzano la stessa reazione ma differiscono per sequenza amminoacidica e proprietà cinetiche.

La diversità molecolare non è casuale; risponde a esigenze funzionali diverse nei diversi tessuti in cui ciascuna forma è espressa.

Origine molecolare

Geni paraloghi

Geni distinti, originati per duplicazione, ciascuno espresso in modo tessuto-specifico — il caso di LDH e CK.

Splicing alternativo

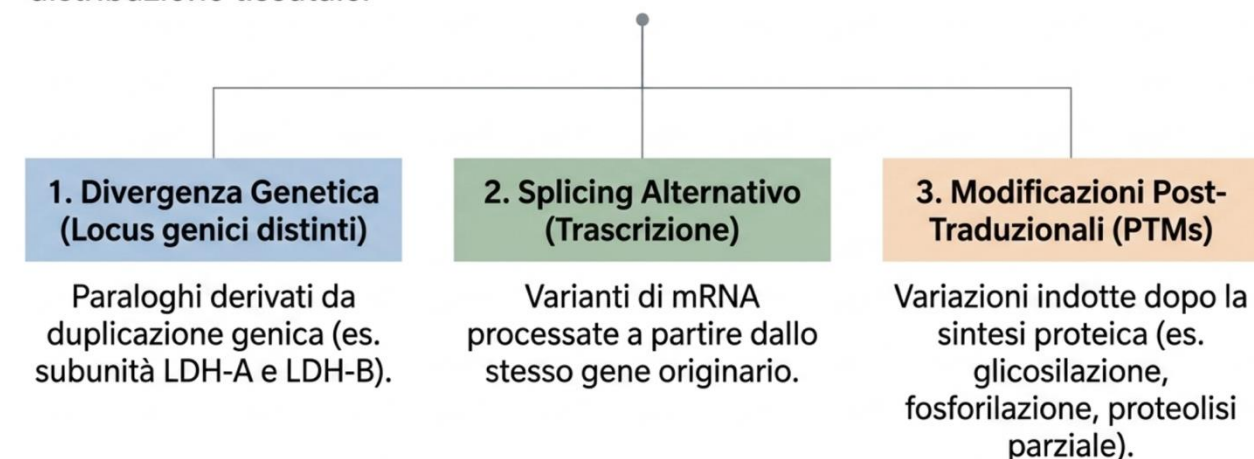
Uno stesso gene genera trascritti diversi, e quindi proteine diverse, a partire dallo stesso mRNA primario.

Modifiche post-traduzionali

traduzionali — altre modifiche della stessa proteina, dopo la sintesi — rilevanti per l'ALP (Lezione 5).

Isoenzimi: specificità diagnostica a livello molecolare

Definizione: Forme multiple di uno stesso enzima che catalizzano la medesima reazione chimica, ma differiscono per proprietà cinetiche, strutturali, e distribuzione tissutale.



Proprietà fisico-chimiche distintive

PROPRIETÀ

COSA CAMBIA TRA ISOENZIMI

Peso molecolare

Migrazione elettroforetica diversa

pH ottimale

Base della distinzione ALP/ACP già vista in Lezione 2

Affinità per il substrato (K_M)

Cinetica diversa a parità di substrato

Stabilità termica

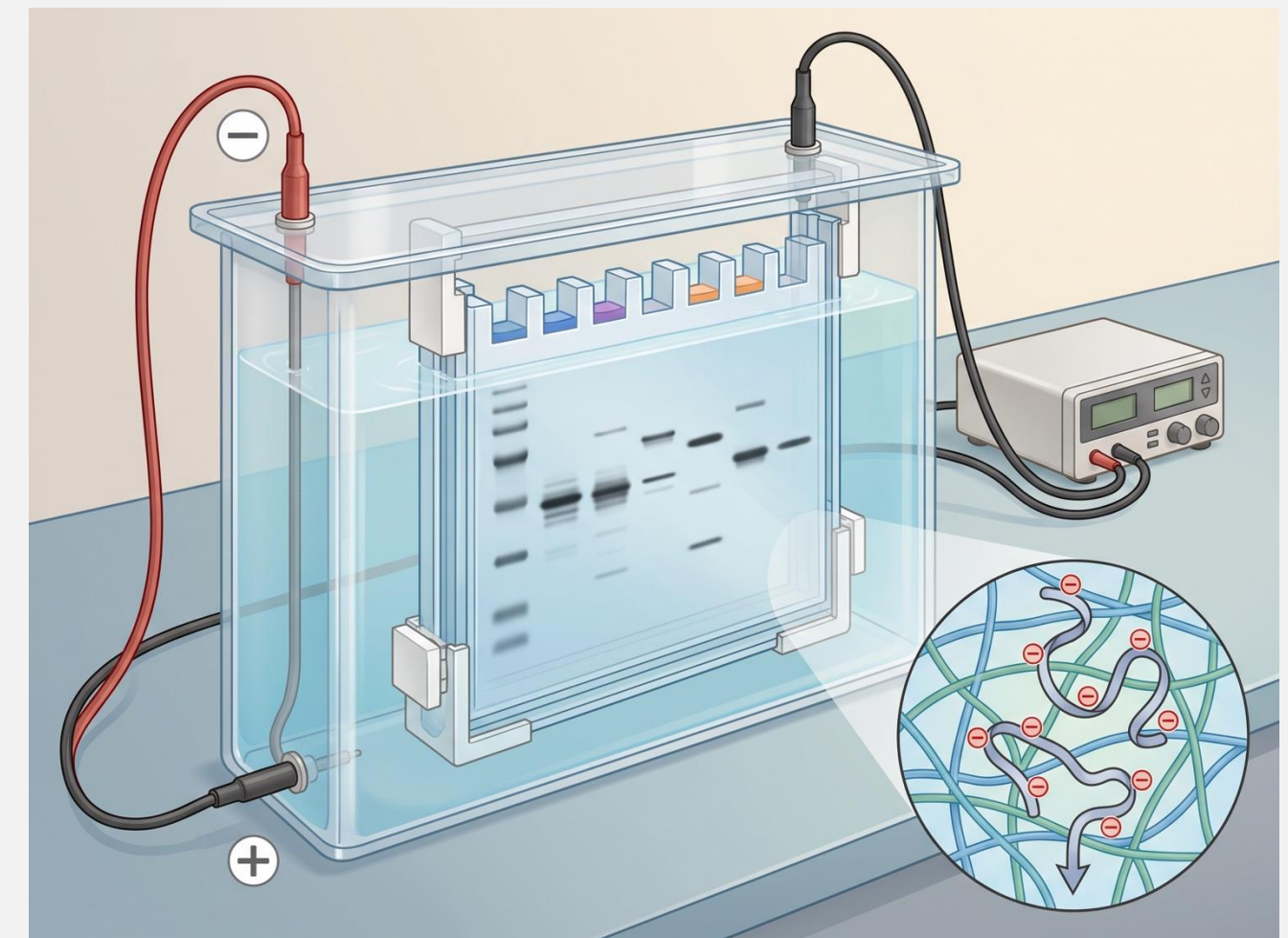
Base dell'inattivazione selettiva per calore

II · ISOENZIMI

Discriminazione per elettroforesi

Sfrutta la diversa carica elettrica netta e la diversa mobilità molecolare degli isoenzimi in un campo elettrico applicato a un supporto (es. acetato di cellulosa).

È la tecnica d'elezione quando servono più di due o tre bande distinte — il caso paradigmatico della LDH, che che vedremo in sezione V.



Discriminazione per inibizione selettiva

Chimica

Un inibitore specifico (es. tartrato per la fosfatasi acida prostatica) azzerava solo l'isoforma target.

Termica

Riscaldamento controllato inattiva le isoforme termolabili, lasciando misurabile la sola frazione residua.

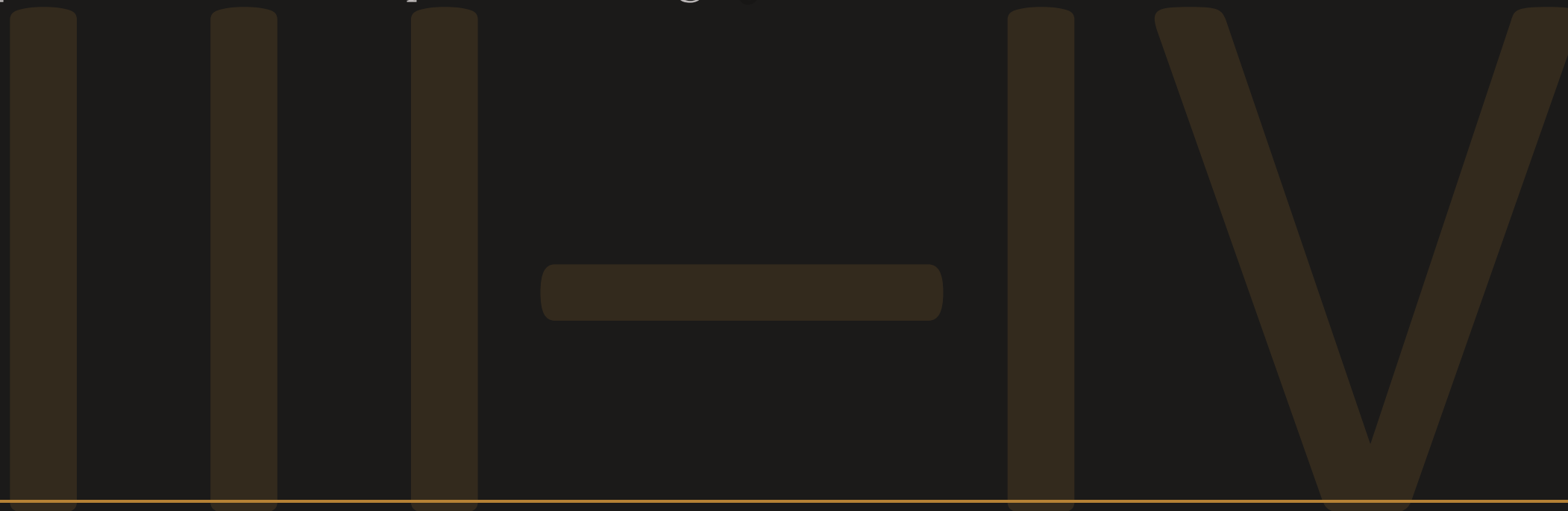
Immunologica

Anticorpi specifici per una subunità isolano l'attività della sola isoforma riconosciuta.

SEZIONE TERZA E QUARTA · 10 MINUTI

Origine nel sangue e compartimentazione

Richiamo rapido da Lezione 2, più una categoria di enzimi non ancora vista.



Richiamo da Lezione 2

Come arriva nel sangue

Necrosi, aumentata permeabilità, induzione della sintesi, ridotta clearance.

Quanto è profondo il danno

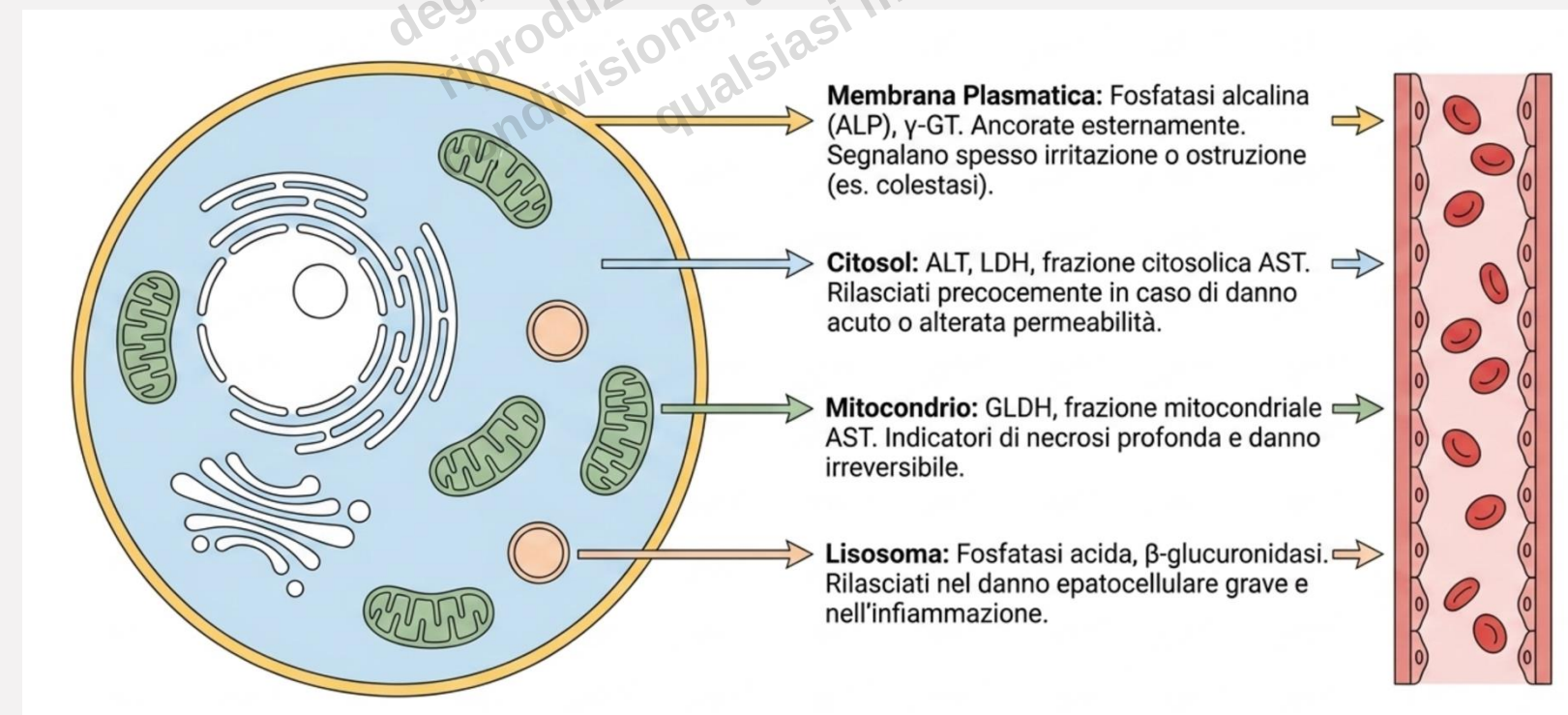
Citosolici → danno lieve/precoce. Mitocondriali → necrosi profonda.

Materiale didattico a uso
personale degli studenti del corso
— © Prof. Sergio Oddi, Università
degli Studi di Teramo. Vietata la
riproduzione, la diffusione e la
condivisione, anche parziale, con
qualsiasi mezzo.

Novità: enzimi di membrana e lisosomiali

Una terza famiglia, oltre a citosol e mitocondri: enzimi ancorati alla membrana cellulare (ALP, GGT) o confinati nei lisosomi (β -glucuronidasi).

Il loro aumento nasce spesso da *induzione* o da *distacco di membrana*, non da necrosi pura — la base concettuale della colestasi, in Lezione 5.



Organo-specifici e non organo-specifici

Organo-specifici

Espressi quasi solo in un tessuto: la loro elevazione da sola orienta la diagnosi topografica.

Non organo-specifici

Presenti in molti tessuti: serve il pattern isoenzimatico per capire da dove vengono — **LDH** e **CK**

Alta Specificità (Enzimi Organo-Specifici)	Permettono una diagnosi topografica diretta e precisa.		
	Fegato/Vie Biliari γ-GT.	Osso Fosfatasi alcalina (isoenzima osseo) - marcatore osteoblastico.	Prostata Fosfatasi acida prostatica (PAP) - marcatore storico del carcinoma.
Bassa Specificità (Enzimi Non Organo-Specifici)	Presenti in molteplici tessuti con metabolismo attivo. L'aumento sierico totale non localizza il danno.		
	AST Fegato, cuore, muscolo scheletrico, rene.	CK Muscolo scheletrico, miocardio, cervello.	LDH Tessuti a metabolismo aerobico/anaerobico.
Il limite degli enzimi ubiquitari rende imperativa l'identificazione delle frazioni specifiche: gli Isoenzimi.			

SEZIONE QUINTA · 20 MINUTI

Paradigmi isoenzimatici: LDH e CK

Due tetrameri e dimeri che traducono la struttura molecolare in geografia tissutale.

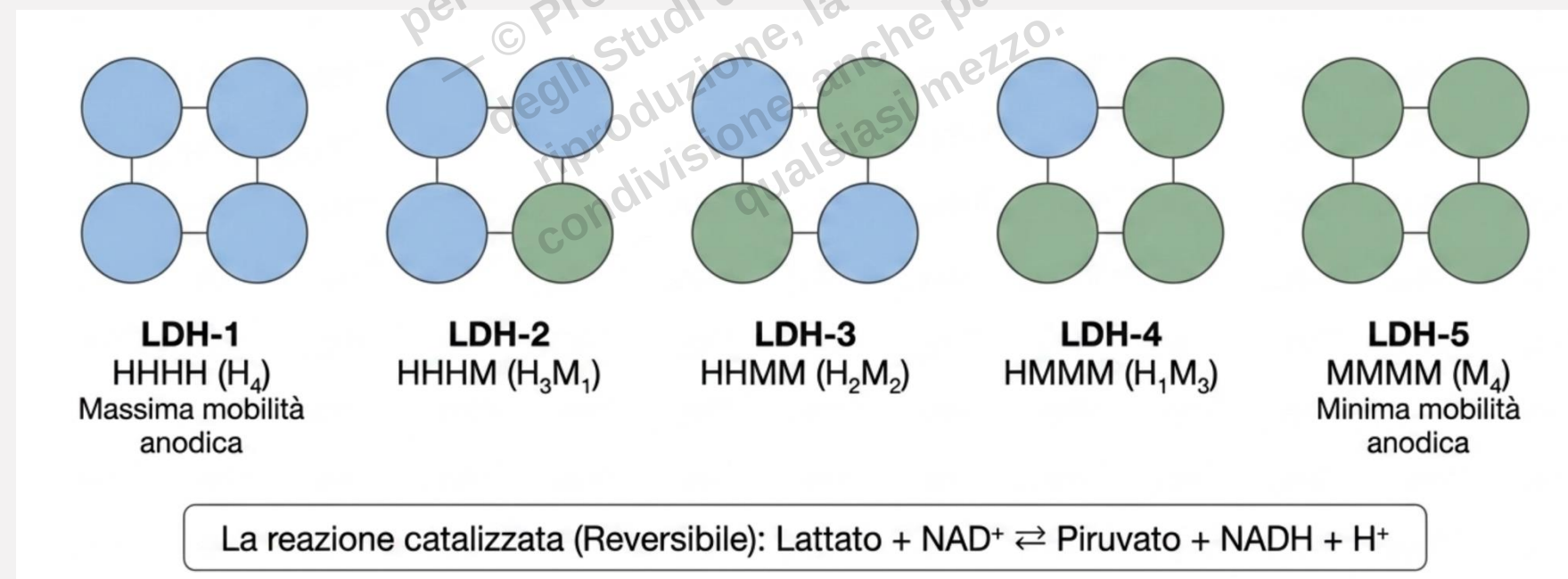
LDH: struttura tetramERICA

Subunità H (gene LDHB)

Ottimizzata per *ossidare* il lattato in piruvato —
metabolismo aerobico.

Subunità M (gene LDHA)

Favorisce la *riduzione* del piruvato in lattato —
glicolisi anaerobica.



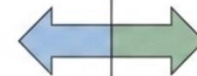
Quattro subunità per tetramero: le combinazioni possibili di H ed M generano cinque isoenzimi.

I cinque isoenzimi LDH e la loro distribuzione

Adattamento metabolico e distribuzione topografica della LDH

Metabolismo Aerobico

- **Isoenzimi:** Predominanza di LDH-1 (H_4) e LDH-2.
- **Cinematica:** Ottimizzati per l'ossidazione del lattato a piruvato (da inserire nel Ciclo di Krebs).
- **Tessuti:** Miocardio (lavoro continuo, alto fabbisogno di O_2), Eritrociti, Rene corticale.



Metabolismo Anaerobico

- **Isoenzimi:** Predominanza di LDH-5 (M_4) e LDH-4.
- **Cinematica:** Ottimizzati per la rapida riduzione del piruvato a lattato (rigenerazione di NAD^+ per la glicolisi).
- **Tessuti:** Muscolo scheletrico (lavoro esplosivo/intenso), Fegato (attività gluconeogenetica).

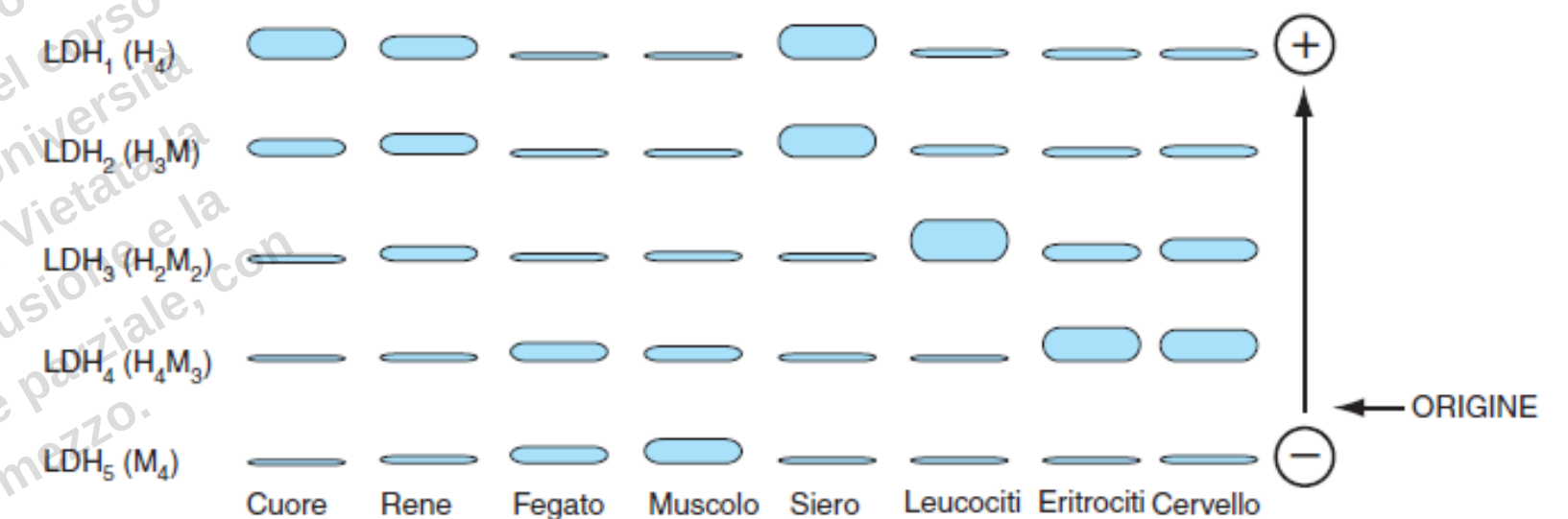


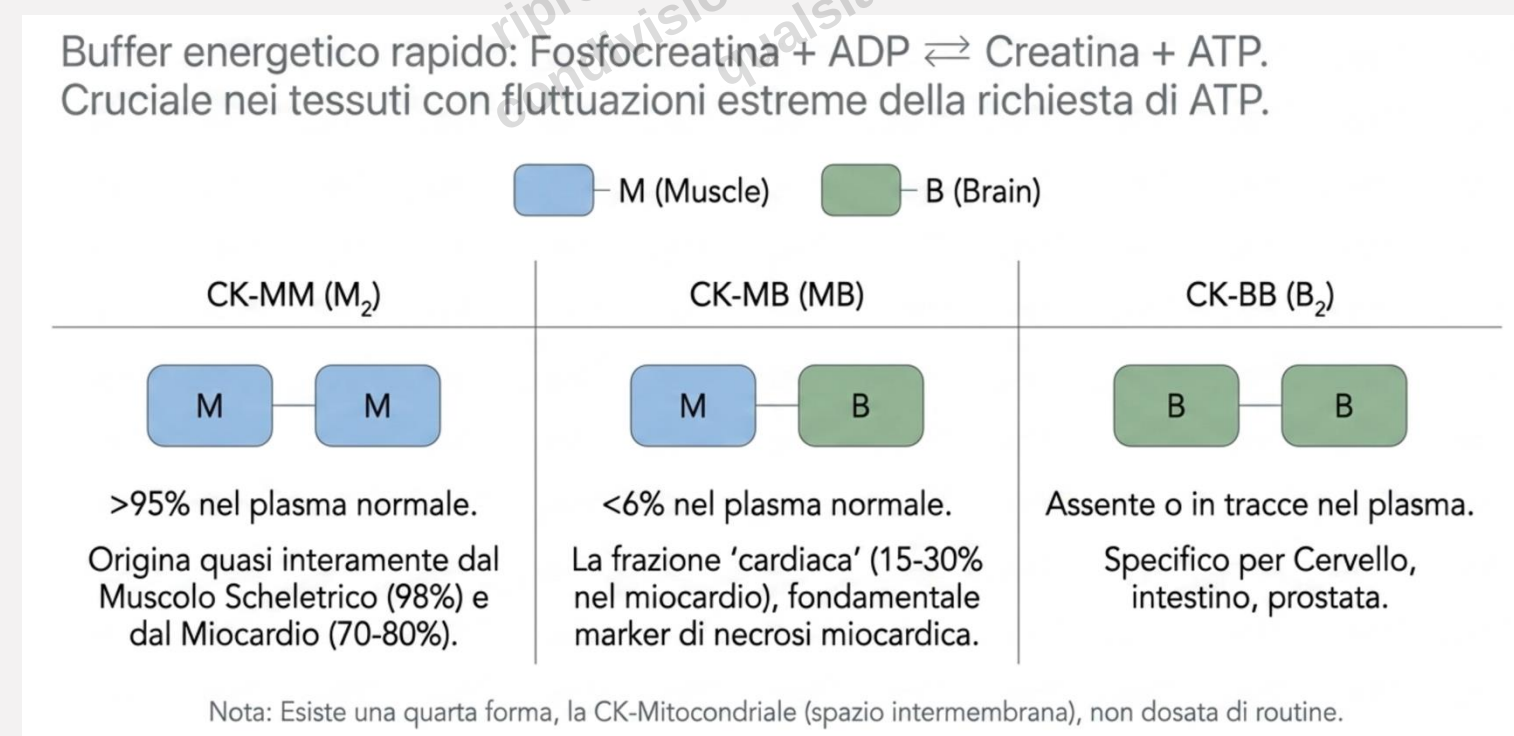
Figura 7.5 Elettroferogramma su acetato di cellulosa degli isoenzimi della lattico deidrogenasi di un siero normale

Dopo la corsa elettroforetica gli isoenzimi vengono evidenziati misurando l'attività enzimatica con un procedimento che porta alla formazione di un formazano colorato (blu-nero) che precipita in situ. Al pH impiegato solo l'isoenzima M_4 (in clinica LDH_5) migra verso il polo negativo; gli altri con velocità diversa verso il polo positivo. Nel siero normale la percentuale degli isoenzimi della lattico deidrogenasi è la seguente: H_4 (LDH_1) 44,5; H_3M (LDH_2) 46,0; H_2M_2 (LDH_3) 3,8; HM_3 (LDH_4) 1,0; M_4 (LDH_5) 0,5.

LDH-1 (H_4) e LDH-2 (H_3M) prevalgono in cuore e rene; LDH-4/5 (M_4) in fegato e muscolo.

CK: struttura dimerica

CK-MM (M ₂)	Muscolo scheletrico e miocardio	> 95% del plasma normale
CK-MB (MB)	Miocardio (fino al 30%), tracce nel muscolo	Marcatore cardiaco (NB04)
CK-BB (B ₂)	Cervello e intestino	Rara in circolo (barriera emato-encefalica)



Origine molecolare degli isoenzimi CK

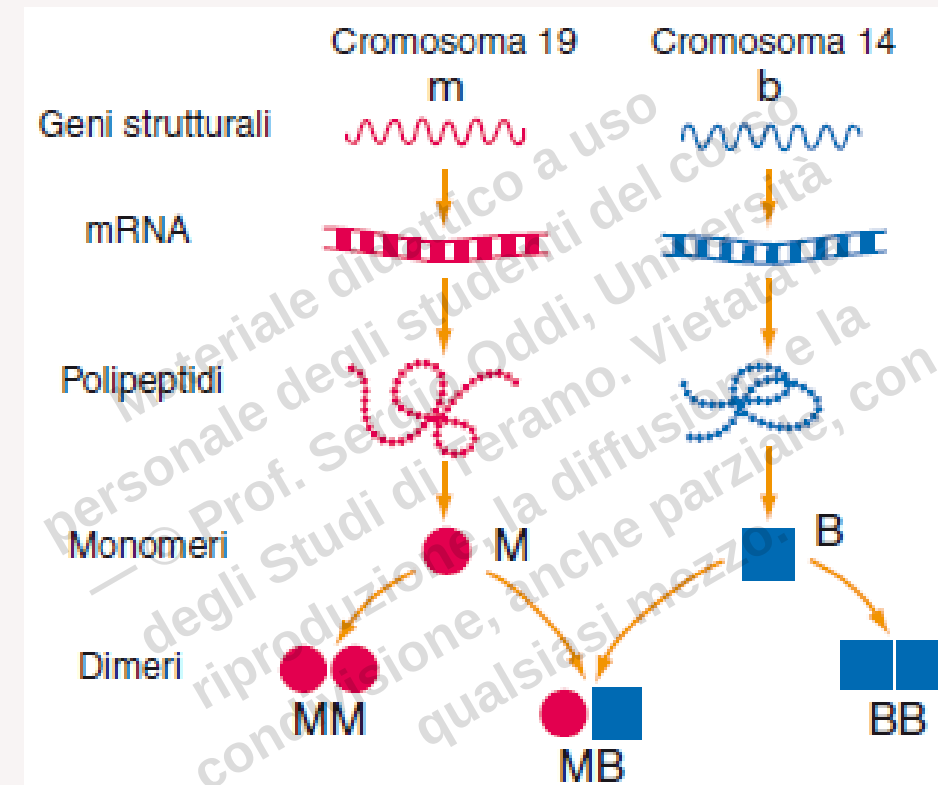


Figura 7.11

Genesi degli isoenzimi della CK. I due geni strutturali, situati nei cromosomi 19 e 14, danno origine ai due monomeri M e B che, combinandosi, formano gli isoenzimi MM, BB e MB.

Due geni strutturali, su due cromosomi diversi, ciascuno per una subunità: è l'esempio concreto dell'origine "geni paraloghi" vista in sezione II.

Distribuzione CK come marcatore

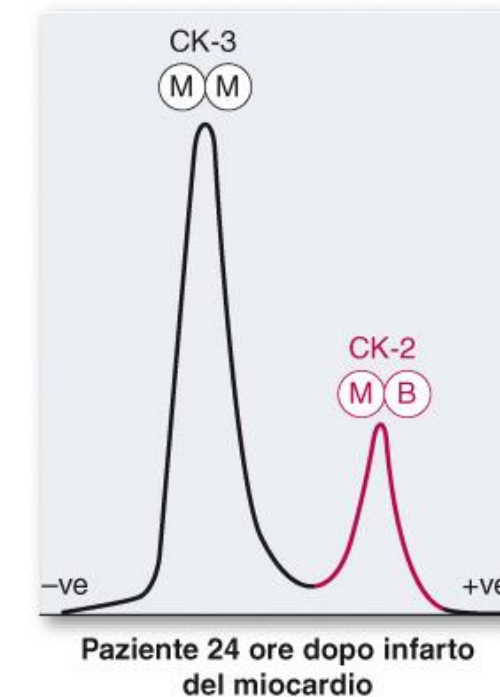
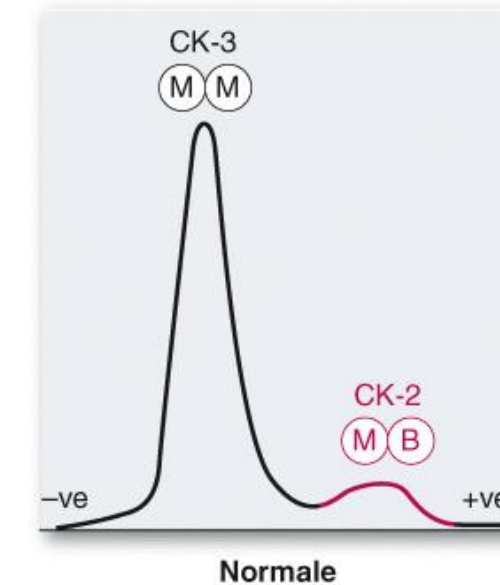
Nel siero normale la banda CK-2 (MB) è appena rilevabile rispetto alla CK-3 (MM) dominante.

La sua comparsa netta, come nel tracciato a destra, orienta verso il danno miocardico — la cinetica completa è in Lezione 4.

Tabella 7.17
Creatina chinasi - isoenzimi nei tessuti (da Lang H, 1981)

Tessuto	CK totale (U/g)	CK-3 (MM)%	CK-2 (MB)%	CK-1 (BB)%
Muscolo Scheletrico	2500	98.9	1.1	0.06
Cervello	555	0	2.7	97.3
Miocardio	473	78.7	20.0	1.3
Retto	267	1.2	0	98.8
Rene	32	2.8	0	97.2
Prostata	114	6	0	94
Utero	115	2.3	0	97.4

Isozimi di creatina chinasi nel sangue



M. Lieberman Marks Biochimica medica Copyright 2010 C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana

V · LDH E CK

Dalla struttura alla diagnosi: il paradigma

Struttura molecolare → distribuzione tissutale → significato diagnostico
molecolare
diagnostico

È lo schema mentale che applicheremo, enzima per enzima, dalla prossima lezione in avanti.

SEZIONE SESTA · 20 MINUTI

Valori di riferimento: principi generali

Cosa significa davvero "normale", e perché non è mai un confine netto.

VI

VI · RIFERIMENTO

Cos'è un valore "normale"

L'intervallo di riferimento è un limite **statistico**, calcolato sulla distribuzione dei valori in una popolazione di soggetti sani — non una soglia biologica assoluta.

In diverse specie animali questa distribuzione è marcatamente asimmetrica, non a campana.

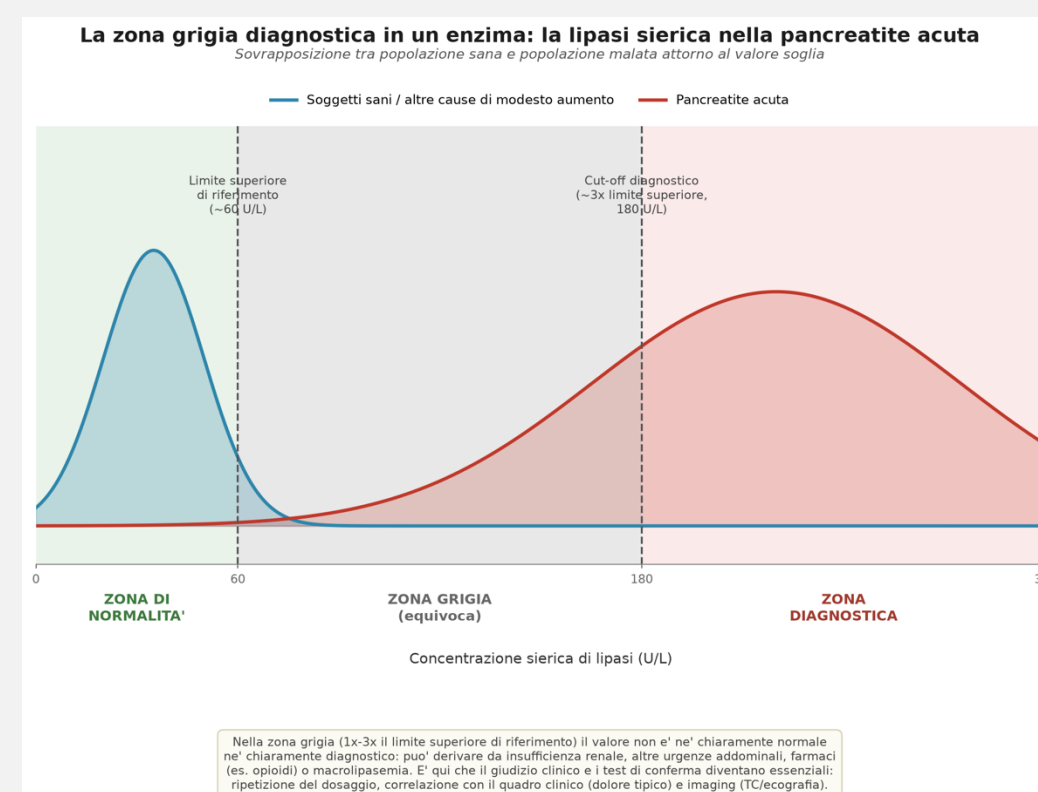
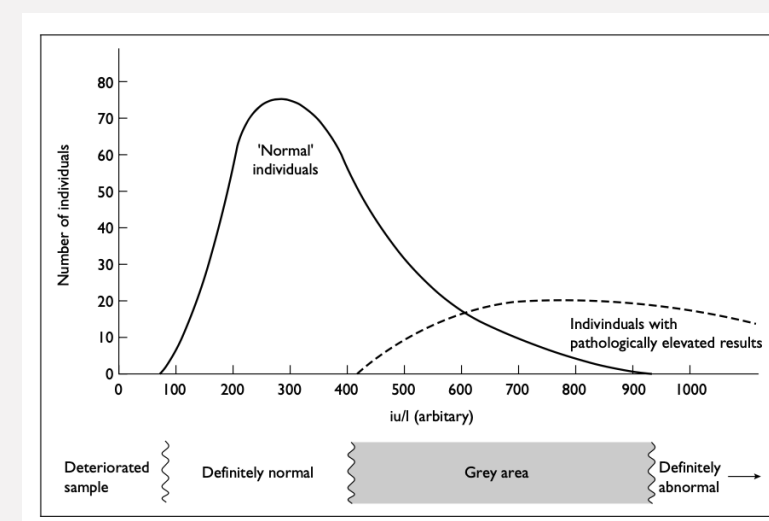
L'area grigia

Tra la normalità certa e la patologia franca esiste una zona intermedia, dove il valore è tecnicamente fuori intervallo ma il significato clinico resta incerto.

Nel **cavallo**, CK, AST e ALT sono gli esempi più frequenti: un lieve aumento aumento isolato, senza segni clinici né altri pattern a supporto, va interpretato con cautela.

La lipasi illustra bene il concetto:

- Zona di normalità — valori entro il limite superiore di riferimento ($\sim 1 \times \text{ULN}$): non indicano danno pancreatico.
- Zona grigia (equivoca) — valori tra $1 \times$ e $3 \times$ il limite superiore: aumenti modesti e non specifici, che possono derivare anche da insufficienza renale, altre urgenze addominali (perforazione, ischemia intestinale), farmaci (es. oppioidi), oltre che da una pancreatite lieve. Il risultato da solo non basta a fare diagnosi.
- Zona diagnostica — valori $\geq 3 \times$ il limite superiore, che insieme al dolore addominale tipico consentono quasi sempre di stabilire la diagnosi di pancreatite acuta, secondo i criteri clinici standard.



VI · RIFERIMENTO

La temperatura di reazione: sempre 37 °C

La velocità catalitica è termodipendente: un dosaggio a temperatura diversa produce un numero diverso per lo stesso enzima, alla stessa concentrazione.

Confrontare dosaggi eseguiti a temperature diverse è un errore metodologico, non metodologico, non un'approssimazione accettabile.

Tre categorie di variabilità

CATEGORIA	ORIGINE	APPROFONDITO IN
Biologica	Età, stato fisiologico (es. gravidanza)	ALP, in Lezione 5
Farmacologica	Induzione enzimatica senza danno reale	GGT, in Lezione 5
Analitica	Emolisi, conservazione del campione	LDH e AST, in Lezione 4

VI · RIFERIMENTO

Verso Lezione 4

Sappiamo ora come si misura un'attività, come si legge un pattern isoenzimatico, e come interpretare un valore rispetto al suo intervallo di riferimento.

Prossima lezione: transaminasi, LDH, CK e i marcatori dell'infarto del miocardio — gli miocardio — gli enzimi di citolisi.

SINTESI

Punti chiave

- 01** La spettrofotometria misura una pendenza (V_0), non un totale statico: $\Delta A/\Delta t$ è il dato grezzo di ogni dosaggio.
- 02** Gli isoenzimi trasformano un'attività aspecifica in una diagnosi topografica.
- 03** LDH e CK insegnano lo stesso schema: struttura molecolare → distribuzione tissutale → significato diagnostico.
- 04** "Normale" è un limite statistico, non un confine biologico netto: attenzione all'area grigia.