



## Lezione 03 — Spettrofotometria e isoenzimi

### Sommario

La prima metà della lezione completa i fondamenti tecnici introdotti nella Lezione 02 — spettrofotometria ed elettroforesi — mentre la seconda inaugura il paradigma degli isoenzimi, destinato a rimanere operativo fino alla Lezione 05. Da questo punto in avanti il corso acquisisce una progressiva concretezza: LDH e CK non compaiono più come esempi generici, secondo l'uso che se ne era fatto nella Lezione 02, ma vengono trattati come i primi due casi di studio in senso proprio, corredati dell'identità genica e della distribuzione tissutale.

La spettrofotometria conferisce sostanza operativa a quanto le lezioni precedenti hanno enunciato in merito alle condizioni del dosaggio: la legge di Lambert-Beer ( $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ ) costituisce lo strumento che consente di convertire un valore di assorbanza in una concentrazione e, per suo tramite, in una misura di attività enzimatica. La nozione di isoenzima introduce a sua volta il passaggio concettuale di maggior rilievo diagnostico dell'intero corso: dalla domanda quantitativa, relativa alla quantità di enzima presente, si passa a quella qualitativa, che riguarda quale forma molecolare sia presente e, di conseguenza, da quale tessuto provenga. LDH e CK rappresentano i due paradigmi molecolari su cui tale principio viene dimostrato: una medesima reazione catalizzata da subunità distinte, variamente combinate e caratterizzate da distribuzione tissutale differente. Conclude la lezione un nucleo di statistica clinica di base, nel quale si stabilisce che l'intervallo di riferimento è un dato di popolazione — il 95% centrale della distribuzione — e non una soglia biologica assoluta; esso conserva validità soltanto se costruito e applicato nelle medesime condizioni tecniche.

### 1. Tecniche di misura

#### 1.1 Non si pesa, si osserva un segnale nel tempo

In Lezione 02 si è detto “si misura una velocità, non una massa” come principio. Uno spettrofotometro segue nel tempo la comparsa o la scomparsa di un segnale colorato, non pesa alcuna sostanza — è lo strumento fisico che materializza la distinzione attività/quantità già vista in Lezione 01 e 02. Non significa che la massa sia irrilevante in assoluto: metodi immunologici (es. ELISA) possono misurare la massa di una proteina enzimatica indipendentemente dalla sua attività, ma la diagnostica enzimatica di routine su cui si concentra questo corso si basa sulla misura dell'attività funzionale.

#### 1.2 La legge di Lambert-Beer

$A = \epsilon \cdot c \cdot d$ , dove  $A$  è l'assorbanza,  $\epsilon$  il coefficiente di estinzione molare,  $c$  la concentrazione,  $d$  il cammino ottico.  $\epsilon$  è specifico per ciascuna sostanza a una data lunghezza d'onda (es. 340 nm per il NADH, 405 nm per il p-nitrofenolo) e non è una costante universale: varia con la lunghezza d'onda e con il solvente/pH della soluzione. La relazione è lineare — raddoppiando la concentrazione, a parità di cammino ottico e lunghezza d'onda, raddoppia l'assorbanza — ed è questa linearità che rende possibile costruire una curva di taratura affidabile. Ad



assorbanze molto elevate lo strumento perde precisione (il segnale “satura”): i campioni troppo concentrati vanno diluiti prima della lettura.

### 1.3 Lo spettrofotometro

Quattro componenti da conoscere: sorgente luminosa, monocromatore (seleziona la lunghezza d'onda, corrispondente al picco di assorbimento del cromoforo), cuvetta col campione (deve essere otticamente trasparente alla lunghezza d'onda scelta — il vetro comune assorbe nell'ultravioletto e richiede cuvette di quarzo per letture a 340 nm), rivelatore (confronta la luce entrante e uscente per calcolare l'assorbanza). Ciascuno di questi quattro componenti è un possibile punto di errore analitico: una sorgente che invecchia perde intensità, un monocromatore mal tarato seleziona una lunghezza d'onda sbagliata, una cuvetta sporca altera la lettura, un rivelatore non calibrato introduce un bias sistematico.

### 1.4 Velocità iniziale ( $V_0$ )

La pendenza della fase lineare iniziale della curva assorbanza-tempo è  $V_0$ : solo questo tratto va usato per calcolare l'attività enzimatica, perché è l'unico in cui substrato saturante e assenza di inibizione da prodotto sono garantiti — più avanti nella reazione il substrato si consuma e il prodotto può accumularsi, alterando la velocità osservata. La pendenza in A/min si converte in un'attività enzimatica (U/L) tramite la legge di Lambert-Beer: è il punto in cui cinetica e fotometria si saldano in un unico calcolo pratico.

### 1.5 Caso applicato: il dosaggio della fosfatasi alcalina

Il substrato PNPP (p-nitrofenilfosfato) è incolore, il prodotto PNP (p-nitrofenolo) è giallo a pH alcalino — un saggio diretto, più semplice concettualmente dei saggi accoppiati (dove la reazione di interesse è collegata a una seconda reazione ausiliaria, spesso con NADH/NAD<sup>+</sup>, per generare un segnale misurabile quando il prodotto primario non è cromoforo). Il fattore di conversione usato (0,05316) è semplicemente il reciproco di  $\epsilon \cdot d$  per il p-nitrofenolo alla lunghezza d'onda usata (tipicamente 405 nm), applicazione diretta della legge di Lambert-Beer — non va imparato a memoria, va capito da dove viene. Il pH alcalino è qui condizione necessaria non solo per l'attività dell'enzima ma anche per la visibilità ottica stessa del prodotto: il PNP è cromoforo (giallo) solo nella sua forma deprotonata, stabile a pH alcalino. Questo stesso saggio è quello eseguito nel laboratorio pratico del modulo.

### 1.6 Standardizzazione: la temperatura

Substrato, buffer e pH sono parte della definizione del metodo (Lezione 02); qui si aggiunge la temperatura. Il suo effetto è quantitativamente rilevante: come regola approssimativa (**Q10**), un aumento di 10°C può raddoppiare la velocità di molte reazioni enzimatiche — un dosaggio condotto a 25°C invece che a 37°C darebbe un risultato sistematicamente sottostimato, non un semplice rumore casuale. Un range di riferimento pubblicato ha senso solo se il laboratorio lavora esattamente alla stessa temperatura standardizzata (in genere 37°C) con cui quel range è stato costruito.



### 1.7 Cenni di elettroforesi

Quando la spettrofotometria misura solo un totale, l'elettroforesi separa le componenti di quel totale: migrazione di molecole cariche in un campo elettrico, a velocità dipendente da carica netta, dimensione e forma, applicata a isoforme dello stesso enzima che differiscono per carica netta pur catalizzando la stessa reazione. Le due tecniche sono complementari, non alternative: la spettrofotometria dice "quanto" (attività totale), l'elettroforesi dice "quali forme" compongono quel totale.

## 2. Isoenzimi

### 2.1 Definizione

Stessa reazione, molecole diverse. Gli isoenzimi catalizzano la stessa reazione chimica ma sono molecole diverse (sequenza, struttura), con distribuzione tissutale specifica — la diversità molecolare è funzionale alla distribuzione tissutale, non casuale. Conseguenza pratica: un dosaggio spettrofotometrico standard misura solo l'attività catalitica totale e, per definizione, non riesce a distinguere gli isoenzimi tra loro — servono tecniche aggiuntive.

### 2.2 Origine molecolare

Tre vie principali, da non confondere: **geni diversi** (il caso più comune, esempi le subunità M e H della LDH), **splicing alternativo** dello stesso trascritto, **modifiche post-traduzionali** (es. glicosilazione, come nel caso dell'ALP). Gli isoenzimi da geni diversi hanno un pattern di distribuzione tissutale geneticamente fissato e molto stabile; le modifiche post-traduzionali possono variare più facilmente in risposta a stimoli fisiologici o patologici.

### 2.3 Proprietà distintive e tecniche di discriminazione

Le tecniche di discriminazione isoenzimatica si basano su specifiche proprietà fisico/chimico/immunologiche che permettono di distinguere un isoenzima dall'altro nella stessa provetta.

- **Elettroforesi:** tecnica d'elezione per pattern complessi a più bande (es. le cinque bande della LDH), dove l'inibizione selettiva non basta da sola. Il risultato è un profilo di bande quantificabile per densitometria, da leggere come pattern relativo, non come singolo valore isolato. È più lenta e costosa di un dosaggio spettrofotometrico, quindi non di routine.
- **Inibizione selettiva chimica o termica:** efficace per pattern semplici a due frazioni. Esempi: acido tartarico per isolare la fosfatasi acida prostatica; calore per distinguere isoforme termostabili da termolabili (riscaldare a temperatura calibrata inattiva selettivamente le forme meno stabili, e per differenza tra attività totale e residua si calcola l'attività della frazione termolabile).
- **Riconoscimento anticorpale:** un anticorpo specifico per una sola isoforma (es. anti-CK-B) può rimuoverla selettivamente o quantificarla direttamente — stesso principio sottrattivo, applicato con uno strumento biologico. Sarà il principio del dosaggio della CK-MB in Lezione 04.



### 3. Nel sangue: richiamo e novità

I meccanismi di iperenzimemia e la localizzazione citosolica/mitocondriale sono già stati esplorati nella Lezione 02 e restano validi senza eccezioni. Aggiungiamo altre due importanti localizzazioni subcellulari: **membrana e lisosomi**.

La **fosfatasi alcalina (ALP)** è ancorata alla membrana con un'ancora GPI (glicosilfosfatidilinositolo), una struttura lipidica che ancora la proteina al foglietto esterno della membrana cellulare. L'aumento della ALP nel plasma nasce spesso da distacco di membrana (ad opera di fosfolipasi che tagliano specificamente il legame che unisce l'enzima alla sua ancora GPI) o da induzione, non da necrosi — un enzima di membrana può comparire nel sangue anche a partire da una cellula perfettamente viva, per semplice turnover della sua superficie. Questo principio è la premessa concettuale della colestasi (Lezione 05): l'ostruzione biliare eleva drammaticamente l'ALP anche in assenza di un vero danno epatocitario diffuso.

Gli **enzimi lisosomiali** seguono una logica diversa: racchiusi in organelli digestivi separati dal resto della cellula, il loro rilascio richiede tipicamente una rottura della membrana lisosomiale, un evento spesso associato a infiammazione o danno cellulare.

Una distinzione conclusiva chiude la sezione: alcuni enzimi sono **organo-specifici** (bastano da soli a orientare la diagnosi, es. la lipasi pancreatica specifica di Lezione 05), la maggior parte però sono **non organo-specifici** e richiedono il pattern isoenzimatico per essere informativi — è esattamente il caso di LDH e CK, che verrà discusso nella prossima sezione.

### 4. LDH e CK: i due paradigmi molecolari

#### 4.1 LDH: struttura e distribuzione

La lattato deidrogenasi è un **tetramero** di due tipi di subunità: **H** (catena B, gene *LDHB*, ossida il lattato a piruvato, metabolismo aerobico) e **M** (catena A, gene *LDHA*, riduce il piruvato a lattato, glicolisi anaerobica) — attenzione, la nomenclatura genica A/B è incrociata rispetto alle lettere H/M. Quattro subunità combinate danno **cinque** composizioni quaternarie possibili: H4 (LDH-1), H3M1 (LDH-2), H2M2 (LDH-3), H1M3 (LDH-4), M4 (LDH-5). La proporzione relativa di ciascuna forma in un tessuto dipende dal rapporto di espressione tra i due geni in quel tessuto. Nei tessuti a metabolismo aerobico l'ordine di abbondanza relativa è H4 > H3M > H2M2 > HM3 > M4. Questa distribuzione tissutale non va confusa con il pattern del siero normale, dove la frazione più rappresentata è LDH-2, seguita da LDH-1: l'inversione delle due (LDH-1 > LDH-2) è il "flip" isoenzimatico, criterio storico d'infarto ripreso in Lezione 04. Cuore ed eritrociti, dipendenti dal metabolismo aerobico continuo, sono ricchi di H4/H3M; fegato e muscolo scheletrico, capaci di intensa glicolisi anaerobica, sono ricchi di M4. Per questo un campione emolizzato altera in modo specifico soprattutto LDH-1 e LDH-2, le frazioni più abbondanti negli eritrociti.

#### 4.2 CK: struttura e origine molecolare

La creatina chinasi è un **dimero**, non un tetramero: due subunità, M e B, combinabili in **tre** distinti dimeri — CK-MM, CK-MB, CK-BB. La CK-MM domina largamente il plasma normale;





la comparsa significativa di MB o BB è essa stessa un segnale (Lezione 04). Due geni strutturali su cromosomi diversi (nell'uomo, **19 per M, 14 per B**), ciascuno tradotto nel proprio monomero; i dimeri si formano dalla combinazione libera dei monomeri all'interno della cellula che li esprime. Un tessuto che esprime quasi solo il gene M (muscolo scheletrico maturo) produce quasi esclusivamente CK-MM; un tessuto che esprime entrambi in proporzioni significative (il miocardio, dove il gene B resta parzialmente espresso) produce anche una quota non trascurabile di CK-MB. La CK-MB, pur essendo storicamente il marcatore cardiaco per eccellenza, non è specifica al 100%: piccole quantità sono presenti anche nel muscolo scheletrico, per cui in clinica si usa il rapporto percentuale CK-MB/CK totale, non il valore assoluto isolato.

### 4.3 Dallo schema struttura-distribuzione alla diagnosi

Schema a tre passaggi da fissare, perché è il metodo generale applicato enzima per enzima da Lezione 04 in avanti: **struttura molecolare** → **distribuzione tissutale** → **significato diagnostico del pattern osservato**. Non è specifico degli isoenzimi, ma è una versione più dettagliata dello schema a tre valori (diagnostico/dinamico/prognostico) di Lezione 02: struttura e distribuzione sono ciò che dà contenuto concreto al "valore diagnostico" di un enzima.

## 5. Valori di riferimento

### 5.1 "Normale" è un intervallo di popolazione

Un intervallo di riferimento comprende convenzionalmente il 95% centrale della distribuzione dei valori osservati in una popolazione di soggetti sani; per definizione statistica, circa il 5% dei soggetti sani presenterà un valore fuori intervallo per puro caso. La conseguenza è più insidiosa di quanto la singola cifra suggerisca, perché la probabilità di errore si compone al crescere del numero di analiti: in un pannello di 12 parametri indipendenti la probabilità che almeno uno cada fuori intervallo in un animale perfettamente sano è pari a  $1 - 0,95^{12} \approx 46\%$ , e sale a circa il 64% con venti parametri. Chi legge un profilo biochimico completo deve dunque attendersi il rilievo fisiologico, e non patologico, di uno o due valori "anomali".

### 5.2 L'area grigia

L'**area grigia** è l'intervallo di valori — tipicamente compreso fra il limite superiore di riferimento e una soglia di due o tre volte tale limite — nel quale le distribuzioni dei soggetti sani e dei soggetti malati si sovrappongono. Non è un difetto del metodo né un'imprecisione del laboratorio: è la traduzione numerica del fatto che due popolazioni biologiche non sono mai separate da una frontiera netta.

Il cavallo è l'esempio guida: CK, AST e ALT possono presentare lievi elevazioni isolate senza significato clinico. Strategia prudente davanti a un valore in area grigia: ripetere il dosaggio a distanza di tempo (valore dinamico) prima di concludere se sia rumore statistico o inizio di un processo patologico.

### 5.3 Temperatura e range di riferimento

La temperatura non è un dettaglio del singolo saggio: è parte della definizione stessa dell'unità di attività, e quindi del valore di riferimento con cui si confronta il dato del paziente. Un range



di riferimento non è mai un dato “assoluto” della biologia dell’enzima, ma un dato costruito su un metodo specifico (substrato, pH, buffer, temperatura) — cambia se cambia anche una sola di queste condizioni tecniche.

### 5.4 Tre categorie di variabilità

Griglia sistematica da applicare prima di sospettare una patologia davanti a un valore anomalo:

1. **Biologica:** età, specie, sesso, stato fisiologico (gravidanza, esercizio).
2. **Farmacologica:** induzione o inibizione enzimatica da farmaci.
3. **Analitica:** interferenze pre-analitiche e tecniche (emolisi, temperatura del saggio, ecc.).

Non introduce concetti nuovi, ma organizza sistematicamente concetti già visti in Lezione 02-03 sotto una griglia di lettura comune.

### 6. Punti chiave

1. La spettrofotometria misura una velocità di reazione tramite la legge di Lambert-Beer, non pesa alcuna sostanza.
2. Gli isoenzimi sono molecole diverse che catalizzano la stessa reazione, distinguibili per proprietà fisiche, chimiche o immunologiche.
3. LDH e CK sono i due paradigmi molecolari che dimostrano come struttura e distribuzione tissutale determinino il significato diagnostico di un pattern.
4. Un valore di riferimento è un intervallo statistico legato a un metodo specifico, non una soglia biologica assoluta.

Da Lezione 04 gli enzimi smettono di essere esempi astratti di un principio generale e diventano protagonisti clinici con un nome, un organo e un significato prognostico specifico.

### Glossario tecnico essenziale

| Termine / Sigla                                  | Definizione                                                                                                            |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><math>A = \epsilon \cdot c \cdot d</math></b> | Legge di Lambert-Beer: assorbanza = coefficiente di estinzione molare $\times$ concentrazione $\times$ cammino ottico. |
| <b><math>V_0</math></b>                          | Pendenza della fase lineare iniziale della curva assorbanza-tempo; unica fase valida per calcolare l'attività.         |



## Basi di Diagnostica di Laboratorio

Prof. Sergio Oddi

| Termine / Sigla               | Definizione                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Isoenzimi</b>              | Molecole diverse che catalizzano la stessa reazione, con distribuzione tissutale specifica.                                                                                        |
| <b>LDHB / LDHA</b>            | Geni delle subunità H (catena B) e M (catena A) della lattato deidrogenasi: H prevale in cuore/eritrociti, M in fegato/muscolo. Nomenclatura incrociata rispetto alle lettere H/M. |
| <b>LDH-1...LDH-5</b>          | Le cinque forme tetrameriche della LDH, da H4 (LDH-1) a M4 (LDH-5).                                                                                                                |
| <b>CK-MM / CK-MB / CK-BB</b>  | I tre dimeri possibili della creatina chinasi (geni M su cromosoma 19, B su cromosoma 14).                                                                                         |
| <b>Ancora GPI</b>             | Lipide che ancora l'ALP al foglietto esterno della membrana plasmatica.                                                                                                            |
| <b>Q10</b>                    | Regola approssimativa: un aumento di 10°C può raddoppiare la velocità di una reazione enzimatica.                                                                                  |
| <b>Intervallo riferimento</b> | <b>di</b> Il 95% centrale della distribuzione dei valori in una popolazione sana; ~5% dei sani cade fuori per puro caso.                                                           |
| <b>Area grigia</b>            | Zona di lieve scostamento dal range, spesso priva di significato patologico per l'asimmetria della distribuzione.                                                                  |