

## IMMUNOLOGIA CLINICA

L'immunologia clinica è quella branca della medicina di laboratorio che usa come strumento di indagine l'anticorpo. L'anticorpo è una molecola specifica in grado di riconoscere un'altra molecola definita antigene. Le caratteristiche della reazione antigene-anticorpo sono simili a quelle della reazione enzima-substrato, pertanto tale reazione sarà specifica e saturabile. La reazione enzima substrato può essere graficamente espressa da un'iperbole. Anche la reazione antigene anticorpo può essere espressa da una curva di questo tipo. La reazione antigene anticorpo prevede che un anticorpo specifico verso un determinante antigene interagisca con questo formando un complesso antigene-anticorpo:  $Ag + Ab \rightleftharpoons AgAb$ ; all'equilibrio quando la reazione sarà bilanciata, avremo che:  $[AgAb]/([Ag] \times [Ab]) = K$ . graficamente si ha un'iperbole, ma la differenza principale con la reazione enzima-substrato è che mentre quest'ultima è una reazione saturabile, la reazione antigene-anticorpo è scarsamente saturabile. Ciò è da ricercare nella struttura degli anticorpi. Questi mostrano 2 catene pesanti e 2 catene leggere unite da ponti S-S; entrambi i tipi di catena contribuiscono a formare i siti specifici di legame per gli antigeni. Quando noi mettiamo un anticorpo in una soluzione contenente un antigene per cui quell'anticorpo è specifico avremo in un primo momento che l'antigene si legherà ai siti specifici dell'anticorpo quando però questi saranno saturati l'antigene comincerà a legarsi anche ai siti specifici dell'anticorpo. Questo legame aspecifico è dimostrato anche nel processo inverso, le cosiddette curve di spiazzamento. Se facciamo reagire un antigene con un segnale con un anticorpo specifico avremo:  $Ag^* + Ab \rightarrow Ag^*Ab$  (\* segnale). All'equilibrio  $[Ag^*Ab]/([Ag^*] \times [Ab]) = K$ . Se a questo sistema si aggiunge un altro antigene simile a quello che già abbiamo fatto reagire ma non segnato, avremo che nel momento in cui il complesso  $Ag^*Ab$  si scinde esso viene rimpiazzato dal complesso  $AgAb$ . I due antigeni competono per il legame con l'anticorpo. Se l'anticorpo ha la stessa attività verso i due tipi di antigene (quello segnato e quello non segnato) la competizione degli antigeni per il legame all'anticorpo sarà vinta dall'antigene presente a concentrazioni maggiori. A questa reazione di spiazzamento una certa quantità di anticorpo sarà comunque legato all'antigene non segnato e precisamente quella quantità in grado di legare i siti specifici dell'anticorpo. Le reazioni antigene-anticorpo risentono quindi notevolmente delle concentrazioni dell'antigene e dell'anticorpo. Esistono numerosissime reazioni immunologiche di cui alcune sono solo qualitative (svelano ad esempio se nel siero del paziente sono presenti o meno anticorpi verso alcuni componenti delle piastrine; in questo modo potremmo diagnosticare o meno una piastrinopenia su base autoimmune) altre sono anche qualitative (cioè svelano anche la concentrazione delle molecole che stiamo studiando; per esempio in un esame dell'insulina ci occorre sapere quanta insulina è presente per diagnosticare un diabete insulino-dipendente o indipendente. Le principali tecniche immunoenzimatiche sono l'immunoprecipitazione e i saggi ELISA. Per quanto riguarda l'immunoprecipitazione, si agisce mettendo nel nostro campione di siero un'adeguata concentrazione di anticorpo specifico per l'antigene (proteina) che vogliamo studiare. L'anticorpo legherà il nostro antigene nel siero; il campione di siero viene poi ultracentrifugato in modo tale che il complesso antigene-anticorpo va a depositarsi sul fondo della provetta. L'antigene sarà poi distaccato dall'anticorpo cambiando ad esempio il pH o altre condizioni del tampone in modo da ridurre l'affinità di legame. L'antigene purificato può quindi essere analizzato per mezzo di altre metodiche di laboratorio oppure si può purificare una piccola quantità di proteine radio marcate e le caratteristiche delle macromolecole possono essere ricavate dal comportamento del tracciante radioattivo in tecniche di separazione quali ad esempio l'elettroforesi. Per quanto riguarda i saggi ELISA (detti anche a sandwich) si agisce usando due tipi di anticorpi che hanno affinità per l'antigene (i due anticorpi riconoscono determinanti diversi per l'antigene). Si agisce legando il primo anticorpo alle provette in cui verrà aggiunto il campione di siero contenente la proteina che vogliamo isolare. Dopo qualche minuto capovolgiamo la nostra provetta eliminando il campione di siero e rimarrà quindi nella provetta solamente l'anticorpo unito

alla provetta che avrà legato l'antigene. A questo punto viene aggiunto un secondo anticorpo marcato e specifico per un sito di legame dell'antigene diverso dal primo anticorpo. questo secondo anticorpo porta legato la biotina che a sua volta porta legato una molecola costituita da amidina e fosfatasi alcalina; queste molecole legate all'anticorpo fanno sì che nessuna molecola di antigene venga persa. Attraverso l'analisi di questo secondo anticorpo possiamo ricavare informazioni sull'antigene da noi studiato.

## Medicina Di laboratorio

La medicina di laboratorio si svolge in tre fasi: una fase pre-analitica, una fase analitica e una fase post-analitica.

- **La fase pre-analitica** riguarda: 1) **la preparazione del paziente**. Il medico chiede al proprio paziente, prima di sostenere un esame, di non fumare, ad esempio, di non mangiare se eventualmente quell'esame deve essere sostenuto a digiuno, i farmaci che il paziente prende, se questi possono o meno interferire con l'esame da sostenere; 2) **Il prelievo del campione**. Generalmente si ha a che fare con due fluidi: le urine e il sangue. Per quanto riguarda il sangue, bisogna sapere quale porzione del sangue esaminare (sangue intero, plasma, siero); per condurre un esame sul siero si fa coagulare il sangue e poi si preleva il siero; a volte è necessario separare il più presto possibile il siero dal coagulo (cellule), perché col passare del tempo le molecole che si trovano all'interno delle cellule passano nel siero (il GR esaurendo le scorte di glucosio lascia fuoriuscire alcuni elettroliti quali ad esempio il K<sup>+</sup>. In un esame in cui interessa il dosaggio del K, ad esempio in un paziente iperteso in cui si sospetta iperaldosteronismo, quindi aumento di aldosterone, ormone che favorisce il riassorbimento di Na e l'eliminazione di K, bisogna stare attenti a separare subito il siero dal coagulo altrimenti il K che fuoriesce dai GR potrebbe falsare il nostro esame). 3) **Conservazione del campione**: il campione prelevato dal paziente deve essere accuratamente ed adeguatamente conservato (anche i tempi sono importanti) per evitare che i dati da noi ricercati siano falsati.

- **La fase analitica** riguarda l'analisi vera e propria di un campione all'interno di un laboratorio. Il laboratorio deve garantire metodiche accurate, sensibili e specifiche. 1) **Accuratezza**: un esempio di accuratezza è il dosaggio di creatin-chinasi, enzima che catalizza il trasferimento di un gruppo fosfato dalla fosfocreatina (molecola ad alta energia contenuta nelle fibrocellule muscolari) all'ADP generando ATP. La creatin-chinasi si trova soprattutto nelle cellule muscolari la sua concentrazione nel sangue aumenta in condizioni di sforzi o incidenti fisici o in caso di infarto del miocardio. La creatinchinasi si trova nei vari tipi di cellule muscolari in diverse isoforme, dosabili mediante gli anticorpi. Il dosaggio delle diverse isoforme può indirizzarci su un'analisi molto accurata del tipo di tessuto interessato da un fenomeno patologico. 2) **Sensibilità**: la sensibilità analitica misura l'attitudine del metodo nel dosaggio del componente da studiare; esso cambia a seconda dell'esame che vogliamo effettuare. Se ad esempio dobbiamo dosare delle proteine possiamo utilizzare sia il metodo calorimetrico sia il metodo della densità ottica: chiaramente non possiamo utilizzare il metodo della densità ottica per dosare una data proteina in un campione di siero in quanto le proteine totali in un campione di siero sono dell'ordine dei grammi (6-7 g) e quindi il grado di assorbimento della luce risulterebbe falsato; il metodo della densità ottica può essere invece utilizzato su un campione di cui avremo preventivamente eliminato le proteine in eccesso che non è nel nostro interesse studiare. Possiamo quindi dire che il metodo della densità ottica risulta poco sensibile nel dosaggio di una proteina in un campione di siero non preventivamente purificato dalle restanti proteine mentre risulta molto sensibile in un campione preventivamente purificato. 3) **Specificità**: la specificità analitica è la caratteristica del metodo di dosare solo ed interamente la sostanza studiata, senza subire interferenze da parte di altre sostanze presenti nel materiale in esame. Le tecniche radioimmunologiche hanno alto grado di specificità in quanto utilizzano anticorpi specifici. Abbiamo detto che i laboratori devono garantire precisione ed accuratezza; a questo riguardo possiamo avere diverse possibilità che possono essere espresse graficamente:

Il laboratorio 1 ha una metodica poco accurata e operatori non precisi; il laboratorio 2 ha una metodica poco accurata ma operatori molto precisi; il laboratorio 3 ha una metodica accurata ma operatori non precisi; il laboratorio 4 ha una metodica accurata e operatori molto precisi. [quanto + i dati che si ottengono (punti rossi) sono raggruppati tanto + gli operatori sono precisi e quanto + sono vicini al centro tanto + la metodica è accurata].

Abbiamo parlato di sensibilità e specificità analitiche; queste vanno distinte dalla sensibilità e specificità diagnostica. La sensibilità diagnostica indica l'incidenza di risposte positive che si ottengono applicando a pazienti affetti da una malattia; in pratica se un test ha sensibilità 100% significa che fornisce 100 risposte positive se effettuato su 100 persone malate. La sensibilità diagnostica è la capacità del test di trovare il maggior numero di pazienti malati. Esempio: in passato un test di screening per carcinoma prostatico nell'uomo adulto si basava sulla ricerca di fosfatasi alcalina prostatica (PAP), che nel tumore aumenta in misura maggiore rispetto all'ipertrofia prostatica, benigna. Tale metodo è stato sostituito con uno più sensibile basato sul PSA (antigene prostatico specifico). Il PSA è una glicoproteina espressa dalle cellule prostatiche; questa esfolia dalle cellule neoplastiche e passa nel sangue dov'è evidenziabile con metodi immunometrici. Questo metodo è più sensibile perché riesce ad evidenziare un numero maggiore di carcinomi rispetto al metodo del PAP. La specificità diagnostica è l'incidenza di risultati negativi che si ottengono applicando il test a soggetti non portatori di malattia; se il test applicato a 100 persone offre 100 risultati negativi la specificità sarà 100%.

–**La fase post-analitica** è l'interpretazione dei dati da parte del medico. Quindi possiamo dire che tra laboratoristi e medici abbiamo un'importante cooperazione e che mentre il laboratorio ha un ruolo fondamentale nella fase analitica, il medico ce l'ha nelle fasi pre e post analitica.

## TRASPORTO DEI LIPIDI NEL PLASMA (LIPOPROTEINE E LORO DOSAGGIO)

Il colesterolo, gli esteri del colesterolo, i fosfolipidi e i gliceridi costituiscono i principali lipidi del nostro organismo; i lipidi sono molecole altamente idrofobiche, esse cioè sono scarsamente solubili in acqua. Affinché i lipidi possano essere trasportati attraverso i fluidi corporei è necessario che essi formino dei complessi molecolari con molecole altamente polari quali le proteine. I lipidi vengono quindi trasportati attraverso il plasma in complessi globulari denominati lipoproteine. Ogni lipoproteina è costituita da una porzione lipidica e da una porzione proteica organizzate in un nucleo interno di lipidi idrofobici circondata da uno strato di lipidi polari (fosfolipidi) e apoproteine. Quindi la porzione più interna delle lipoproteine presenta trigliceridi ed esteri del colesterolo (palmitato di colesterolo ecc.) mentre la porzione + esterna presenta colesterolo libero, fosfolipidi e apoproteine. La componente proteica a sua volta è organizzata in modo che i residui aminoacidici idrofobici guardino verso la componente lipidica interna mentre quelli idrofili si dispongono nella porzione più esterna a contatto col plasma. La componente proteica delle lipoproteine è caratterizzata da particolari proteine che vanno sotto il nome di apoproteine; sono noti diversi tipi di apoproteine: APO-A1, APO-A2, APO-B48, APO-B100, APO-C, APO-E. Esse oltre ad avere un ruolo fondamentale per quanto riguarda la solubilizzazione dei lipidi idrofobici, contengono anche segnali che regolano l'ingresso e l'uscita dei lipidi da cellule e tessuti e agiscono anche come cofattori di importanti enzimi. Esistono diversi tipi di lipoproteine le quali vengono classificate in base alla loro densità (rapporto massa/volume). Abbiamo così chilomicroni, VLDL (lipoproteine a bassissima densità), IDL (lipoproteine a densità intermedia), LDL (a bassa densità) e HDL (ad alta densità).

I chilomicroni sono lipoproteine a densità bassa  $<1$  (sono + leggere dell'acqua e non vanno a fondo); contengono 1,5-2,5% di proteine e il 97-99% di lipidi, principalmente trigliceridi all'84-89%. I chilomicroni vengono formati nella mucosa intestinale durante l'assorbimento dei prodotti della digestione dei lipidi. Entrano in circolo attraverso il dotto linfatico e la vena azygos che sbocca nella vena cava. La componente proteica dei chilomicroni è caratterizzata prevalentemente da APO-B48 che ha un ruolo importante nella secrezione dei chilomicroni dalle cellule intestinali negli spazi linfatici. Nella circolazione ematica acquistano l'apoproteina APO-C II che è un cofattore della lipoproteinlipasi. Questo enzima è localizzato sulla superficie cellulare endoteliale dei capillari di vari tessuti tra cui soprattutto il tessuto muscolare striato e tessuto adiposo. La lipoproteinlipasi idrolizza la maggior parte dei trigliceridi contenuti nei chilomicroni. Durante la lipolisi i chilomicroni diminuiscono di volume, le apolipoproteine e i lipidi in eccesso sono trasferite alle HDL, mentre quest'ultime trasferiscono APO-E sui residui chilomicronici, in modo tale da essere captati dal fegato, che possiede recettori per le APO-E; nel fegato i residui chilomicronici sono degradati da lipasi e proteasi.

VLDL: i trigliceridi e il colesterolo di origine endogena o derivati dai residui chilomicronici vengono elaborati dal fegato a formare le VLDL; sono di materiale lipidico proveniente dal RE liscio e si arricchiscono di apolipoproteine provenienti dal RE ruvido formando le lipoproteine nascenti. Dopo essere state inglobate in vescicole, vengono secrete. Le VLDL (densità bassa intorno a 1) sono ricche soprattutto di esteri del colesterolo e trigliceridi. La componente proteica è caratterizzata soprattutto da APO-B100 (favorisce la secrezione delle VLDL dal fegato), APO-C (attiva la lipoproteinlipasi), APO-E (favorisce il passaggio di lipidi al fegato attraverso l'interazione con recettori per le LDL). Si conoscono tre isoforme di questi recettori che differiscono tra loro per un solo aminoacido: E3 (un residuo di cisteina e uno di arginina), E2 (due cisteine; ha un'affinità per il recettore molto inferiore rispetto alle altre due e in individui omozigoti per l'allele e2 causa iperlipidemia di tipo 3), E4 (due arginine, sembra predisporre al morbo di Alzheimer). Le VLDL vengono idrolizzate a livello dei capillari dalla lipoproteinlipasi e si formano IDL.

IDL: (lipoproteine a densità intermedia) quelle che non vengono captate dal fegato rimangono in circolo dove continuano a rilasciare trigliceridi ad opera delle lipoproteinlipasi caricandosi invece di esteri del colesterolo, rilasciati dalle HDL. In questo processo interviene un enzima denominato lecitina-colesterolo-aciltransferasi (LCAT) che utilizza come cofattore APO-A1 e APO-A2. Le IDL cariche di esteri del colesterolo diventano così LDL.

LDL: (lipoproteine a densità bassa  $<1$ ) vengono riconosciute dai tessuti per mezzo di recettori che riconoscono le apoproteine APO-B100 e APO-E (ma non APO-B48) e qui nei tessuti esse rilasciano colesterolo. Il colesterolo è un costituente essenziale delle membrane cellulari e viene anche usato dalle cellule o ghiandole endocrine specifiche per formare ormoni steroidei. Il colesterolo in eccesso a livello dei tessuti viene caricato da un altro tipo di lipoproteina la cui principale funzione è quella di trasportare questo colesterolo al fegato dove viene eliminato con la bile. Queste lipoproteine sono le HDL (a densità alta con rapporto proteine/lipidi a vantaggio delle proteine). Le HDL

assumono colesterolo anche da cellule morte o da membrane in fase di turnover. Posseggono l'apoproteina APO-E, riconosciute dai recettori epatici APO-A I e II che sono rispettivamente attivatore e cofattore della LCAT, ovvero la lecitina colesterolo aciltransferasi: quest'enzima esterifica il colesterolo presente su HDL, facendogli perdere polarità e quindi facendolo spostare all'interno delle HDL, dove assume forma sferica. Parte del colesterolo di HDL viene trasferito in circolo alle IDL.

CHILOMICRONI	1,5-2,5%	97-99%	7-9	3-5	1-3	84-89
VLDL	5-10%	90-95%	15-20	10-15	5-10	50-65
IDL	15-20%	80-85%	22	22	8	30
LDL	20-25%	75-80%	15-20	35-40	7-10	7-10
HDL	50-55%	50%	20-25	12	3-4	3

Riassumendo, le principali apoproteine sono:

APO-A : le APO-A1 e APO-A2 rappresentano il 10% del totale delle proteine delle HDL e sono nel rapporto di 3:1 a favore delle APO-A1. Le APO-A1 rappresentano il cofattore per le LCAT, le APO-A2 rappresentano l'attivatore delle LCAT.

APO-B : ne esistono due isoforme, APO-B100 e APO-B48; esse rappresentano il fenotipo di un singolo gene strutturale che in APO-B100 è completamente espresso sui 2 alleli (omozigote) mentre in APO-B48 è eterozigote. APO-B48 si trova nei chilomicroni e nei residui chilomicronici; oltre ad essere parte strutturale dei chilomicroni è importante per la secrezione dei chilomicroni dalle cellule intestinali negli spazi linfatici. APO-B100 è sintetizzato dal fegato; esso è la maggiore componente delle LDL. Favorisce la secrezione delle VLDL da parte del fegato.

APO-C : si trovano in tutte le lipoproteine ad eccezione delle LDL. APO-CII ha un ruolo importantissimo nelle VLDL e nei chilomicroni in quanto funzionano da attivatore delle lipoproteinchinasi.

APO-E : è presente nei chilomicroni, nelle VLDL e nelle HDL; promuove l'uptake dal fegato attraverso l'interazione con i recettori destinati alle LDL (B ed E). si conoscono tre isoforme di recettori E che variano per un solo residuo aminoacidico.

Le lipoproteine vengono separate per mezzo di un'elettroforesi lipoproteica: maggiore è la componente proteica, più lipoproteine corrono velocemente nella corsa elettroforetica. Abbiamo quindi che le HDL sono le più veloci e costituiscono quello che viene detto la banda  $\alpha$  del siero sottoposto ad elettroforesi. Le VLDL sono le seconde più veloci e costituiscono la banda pre- $\beta$ . Le VLDL sono più veloci delle LDL nonostante abbiano una quantità totale di proteine minore delle LDL in quanto esse contengono l'apolipoproteina APO-C che le LDL non posseggono. APO-C per le sue caratteristiche chimico fisiche rende le VLDL più veloci delle LDL nella corsa elettroforetica. Le LDL sono le terze più veloci e costituiscono la banda  $\beta$ . I chilomicroni sono le lipoproteine più lente; sono quasi immobili essendo costituite quasi essenzialmente da lipidi. L'elettroforesi ipoproteica separa bene la banda  $\alpha$  e la banda  $\beta$ , ma non ugualmente bene la banda pre- $\beta$  e  $\beta$ . Tra la banda  $\alpha$  e la pre $\beta$  si può individuare una molecola che interferisce nei processi che mantengono l'equilibrio tra attività fibrinolitica e coagulante. E' quindi interessante individuare questa particolare molecola nel plasma. APO-A1 è significativo delle HDL. APO-B è significativo dei chilomicroni (APO-B48) e delle LDL (APO-B100). Il rapporto APO-B/AO-A1 è quindi significativo del rapporto  $(pre\beta + \beta)/\alpha$ ; questo rapporto è importante perché è correlato all'incidenza delle malattie cardiovascolari. Se poniamo su un asse cartesiano il numero di persone che costituiscono il nostro campione e il rapporto  $(pre\beta + \beta)/\alpha$ , noteremo un picco della nostra curva intorno a 3.

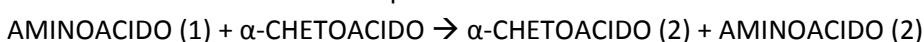
Le persone che hanno un rapporto intorno a 5 (curva 2) presentano patologie cardiovascolari. A proposito del colesterolo, abbiamo un colesterolo totale, un colesterolo legato alle HDL e uno legato alle LDL. Il colesterolo cosiddetto buono è quello associato alle HDL. Un rapporto HDL/LDL a favore delle HDL riduce il rischio di malattie cardiovascolari. Risulta quindi utile separare il colesterolo legato alle LDL da quello legato alle HDL per mezzo di un anticorpo immunoprecipitante che è in grado di legarsi alle HDL o alle LDL e di farle precipitare escludendole. Poi dal colesterolo totale sottraendo il colesterolo che abbiamo dosato con la tecnica dell'anticorpo immunoprecipitante possiamo ricavare anche l'altra componente di colesterolo.

## Enzimologia Clinica

Nel siero si trovano alcune concentrazioni di enzimi che vengono considerate normali per un determinato intervallo di valori. Generalmente le proteine enzimatiche svolgono la loro funzione all'interno delle cellule; ma gli enzimi vengono riscontrati anche nel siero a causa del fisiologico turnover delle cellule. Questo significa che quando una cellula muore il suo contenuto tende ad uscire, o anche in caso di stress della cellula, cioè quando la cellula non riesce, in condizioni di sofferenza, a produrre la necessaria quantità di ATP che fisiologicamente serve a mantenere le proteine all'interno della membrana cellulare. A fuoriuscire saranno prima gli ioni più piccoli (potassio) e poi le cellule più grandi. È, quindi, molto importante il dosaggio delle proteine enzimatiche nel siero in quanto un loro eccesso viene interpretato come una spia, un segnale di allarme che prelude a sofferenze cellulari e tissutali. La fuoriuscita delle proteine è un fatto patologico in sé, ma non perché queste sono tossiche; le transaminasi non sono enzimi tossici, ma possono svolgere la loro attività funzionale solo all'interno della cellula. Il dosaggio di queste proteine ad attività enzimatica, sfrutta la loro attività funzionale; in un certo senso siamo fortunati a dover dosare enzimi, perché proteine prive di attività funzionale andrebbero ricercate mediante gli anticorpi, con esami certamente più costosi. Tuttavia bisogna fare attenzione perché l'attività funzionale di una proteina non è sempre indicativo della sua quantità all'esterno della cellula: proteine mutate da processi neoplastici possono presentare un'attività funzionale diversa, o non presentarla affatto. Dunque l'enzimologia clinica, sfruttando l'attività catalitica delle proteine enzimatiche ne mette in evidenza la presenza e la quantità nel siero. Per capire come si procede in un dosaggio di enzimologia clinica prendiamo come esempio la lattico- deidrogenasi (LDH). Nei globuli rossi la lattico-deidrogenasi riduce l'acido piruvico in lattato.

$\text{ACIDO PIRUVICO} + \text{NADH} \leftrightarrow \text{LATTATO} + \text{NAD}^+$  Quindi per il dosaggio della proteina enzimatica mettiamo nel nostro siero acido piruvico e NADH e dopo che sia avvenuta la reazione andiamo a dosare o l'NADH rimasto in soluzione o il NAD che si è formato nella reazione. Questo dosaggio può essere fatto con il metodo della densità ottica. La velocità massima di una reazione enzimatica dipende dalla quantità di enzima presente. Man mano che la concentrazione di substrato aumenta, aumenta anche la velocità di reazione. Quando tutto l'enzima è saturato la velocità di reazione smette di aumentare in quanto non è più dipendente dalla concentrazione di substrato e si ha quella che viene chiamata  $V_{\max}$ . Quindi se vogliamo conoscere la quantità di enzima in un campione di siero dobbiamo porre in questo campione una quantità di substrato saturante. In questa condizione l'entità della reazione è correlata alla quantità di enzima presente. Quindi per dosare un enzima nel siero dobbiamo mettere nel nostro campione una quantità di substrato saturante. Come si fa a sapere qual è la concentrazione saturante del substrato? Per essere sicuri di mettere nel siero la giusta concentrazione di substrato ci si avvale della cosiddetta  $K_m$ .  $K_m$  è la concentrazione del substrato per cui si ha  $\frac{1}{2} V_{\max}$  della reazione. Se poniamo nel nostro siero una concentrazione di substrato che sia 10-20 volte  $K_m$  siamo sicuri di avere una concentrazione saturante. Un'altra soluzione è quella di diminuire la quantità di enzima e quindi di prendere un campione di siero più piccolo.

TRANSAMINASI (aspartato amino transferasi : AST, alanina amino transferasi: ALT). Le transaminasi sono enzimi implicati nella transaminazione, ovvero nella interconversione di aminoacidi e chetoacidi, e sono quindi necessarie nel metabolismo epatico dell'azoto e dei carboidrati. La tipica reazione catalizzata dalle transaminasi è:

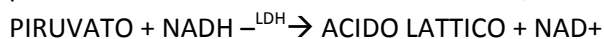


Le transaminasi utilizzano il piridossalofato come trasportatore temporaneo del gruppo amminico.

Per ALT avremo:  $\text{ALANINA} + \alpha\text{-CHETOGLUTARATO} \xrightarrow[\text{-PLP}]{\text{ALT}} \text{PIRUVATO} + \text{GLUTAMMATO}$  Per

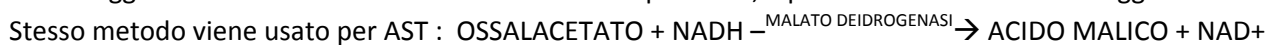
AST avremo:  $\text{ASPARTATO} + \alpha\text{-CHETOGLUTARATO} \xrightarrow[\text{-PLP}]{\text{ALT}} \text{OSSALACETATO} + \text{GLUTAMMATO}$  Per dosare le transaminasi dobbiamo mettere concentrazioni saturanti di substrato e misurare o i substrati che si consumano o i prodotti che si ottengono. Siccome a questo punto risulta difficile dosare i substrati o i

prodotti di queste reazioni, si agisce promuovendo una nuova reazione in cui si fa reagire il piruvato prodotto nella reazione di transaminazione, ad esempio con il NADH aggiungendo LDH come enzima:



A questo punto si usa LDH per mezzo

del dosaggio di NADH rimasto in soluzione o di NAD<sup>+</sup> prodotto, e poi a ritroso si risale al dosaggio di ALT.



ALT e AST sono presenti nel fegato, nel muscolo, nel cuore, dove partecipano alla transaminazione degli aminoacidi in energia. Quando le cellule epatiche o quelle muscolari sono danneggiate le transaminasi si riversano nel sangue aumentando la loro concentrazione. Entrambe queste transaminasi sono localizzate nel mitocondrio, l'ALT si trova anche nel citosol: questo esce prima nelle varie situazioni di stress (gli enzimi e le proteine citoplasmatiche escono prima di quelle mitocondriali), quindi il rapporto ALT/AST nel sangue è superiore a 1. Modesti rialzi delle transaminasi possono rivelare una steatosi epatica o altre patologie muscolari di altro genere. È utile però effettuare l'analisi delle transaminasi a digiuno e a riposo, in quanto anche un'attività sportiva diffusa può far aumentare le transaminasi in circolo.

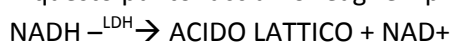
**AMILASI:** l'amilasi è un enzima idrolitico che rompe legami glicosidici: la troviamo nelle ghiandole salivari, nella parotide, nel pancreas. Valori alti si possono riscontrare in presenza di pancreatiti acute e croniche, nell'infiammazione della parotide ecc. Per distinguere se il suo aumento è di origine pancreatico o salivare si fanno ulteriori esami; ad esempio se sospettiamo che essa sia di origine pancreatica dovremmo aspettarci anche un aumento di altri enzimi pancreatici quali la lipasi.

**CREATINCHINASI:** trasferisce fosfati dalla fosfocreatina (molecola ad alta energia contenuta nelle fibrocellule muscolari) all'ADP generando ATP. La creatinichinasi si trova soprattutto nelle cellule muscolari (muscoli striati, muscolatura liscia, muscolatura cardiaca) e la sua concentrazione nel sangue aumenta in condizioni di sforzi e accidenti fisici o in caso di infarto del miocardio. La creatinichinasi si trova nei vari tipi di cellule muscolari in diverse isoforme; queste possono essere dosate col metodo degli anticorpi. Il dosaggio delle diverse isoforme può costituire un esame importante che ci fornisce un'analisi accurata sul tipo di tessuto interessato da un certo fenomeno patologico. Se ad esempio abbiamo un paziente che in seguito ad un infarto cardiaco è caduto provocandosi un accidente muscolare, riusciamo col metodo del dosaggio con anticorpi delle creatinichinasi, a capire quale dei due fenomeni è quello principale. Una tipica reazione catalizzata dalla creatinichinasi può essere:

$$\text{ACIDO ACETICO} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{CREATINCHINASI}} \text{CREATINA} + \text{ADP}$$

Per dosare la creatinichinasi facciamo reagire l'ADP ricavato dalla reazione catalizzata dall'enzima con l'acido fosfoenolpiruvico:  $\text{ADP} + \text{FOSFOENOLPIRUVATO} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{PIRUVATO}$  (la quantità di piruvato dipende da ADP e quindi dalla 1 reazione)

A questo punto facciamo reagire il piruvato con il NADH:



PIRUVATO +

Quindi si dosa LDH e

poi si risale a ritroso alla concentrazione di creatinichinasi. Tutte queste reazioni devono essere chiaramente effettuate in condizioni di substrato saturante.

#### GAMMA-

**GLUTAMILTRANSFERASI (γGT):** è un marker della sofferenza epatica. Catalizza la reazione di trasferimento di un residuo di acido glutamico a un accettore che è la cisteina. Esso agisce durante il metabolismo di alcune proteine. Si utilizza l'anilina che è cancerogeno ma a piccole dosi si può legare all'acido glutammico che poi si lega a due glicine formando un tripeptide grazie all'azione di γGT con la liberazione di paranitroanilina. La paranitroanilina può essere dosata facilmente dal momento che è colorata. Quindi si misura l'aumento dell'assorbanza della lunghezza d'onda relativa.

**FOSFATASI ALCALINA (ALP):** è un enzima idrolitico che rompe un legame covalente in cui è implicato un acido fosforico (legame di estere). La fosfatasi alcalina è un'esterasi che si trova soprattutto nelle cellule ossee dove libera fosfati e nelle membrane delle cellule epatiche e delle vie biliari (sono isoenzimi diversi). La sua concentrazione nel sangue aumenta quando l'osso è sofferente, come nelle metastasi ossee, o quando vi sia un ostacolo al deflusso della bile, nella colicosi biliare. Per dosare questo enzima si usa un

substrato che lega la fosfatasi con un legame di estere: il paranitrofenolfosfato:

PARANITROFENOLFOSFATO  $\xrightarrow{-\text{PLP}}$  PARANITROFENOLO + P Dosando il paranitrofenolo, che tra l'altro è colorato risaliamo alla concentrazione di PLP. Un aumento dell'isoenzima osseo è fisiologico nel bambino e nell'adolescente, perché in fase di crescita.

Al di là degli esami di laboratorio è importante l'interpretazione del medico. Vanno presi in esame diversi aspetti, come il corredo genetico degli enzimi, che si esprimono in maniera peculiare nei diversi tessuti. Ad esempio LDH è un enzima tetramericco composto da due differenti sub unità. Il cuore contiene soprattutto il tipo H, mentre il muscolo scheletrico ed il fegato contengono il tipo M; queste due sub unità sono codificate da geni differenti. Con le subunità H e M si possono formare 5 tipi di tetramero chiamati isoenzimi: H4 (LDH1) tipica del cuore, M4 (LDH5) tipica del fegato, le altre isoforme renali, polmonari muscolari...Visto quindi che la distribuzione degli isoenzimi differisce a seconda del tessuto considerato, è possibile diagnosticare un danno ad un particolare tessuto misurando l'attività totale dell' LDH e quindi il profilo dei suoi isoenzimi. La differenziazione può essere fatta con l'elettroforesi, o l'affinità per diversi substrati; es: H4 non usa solo acido lattico ma anche il  $\beta$ -idrossibutirrato.

Un'altra caratteristica importante da considerare è l'emivita in circolo degli enzimi. Ad esempio la creatinichinasi dopo 18 ore non si riscontra più nel sangue; quindi un dosaggio di quest'enzima dopo 18 ore ad un infarto, non ha senso. Bisognerà quindi dosare altre proteine che hanno una emivita più lunga e che è patognomica per l'infarto (troponina T).