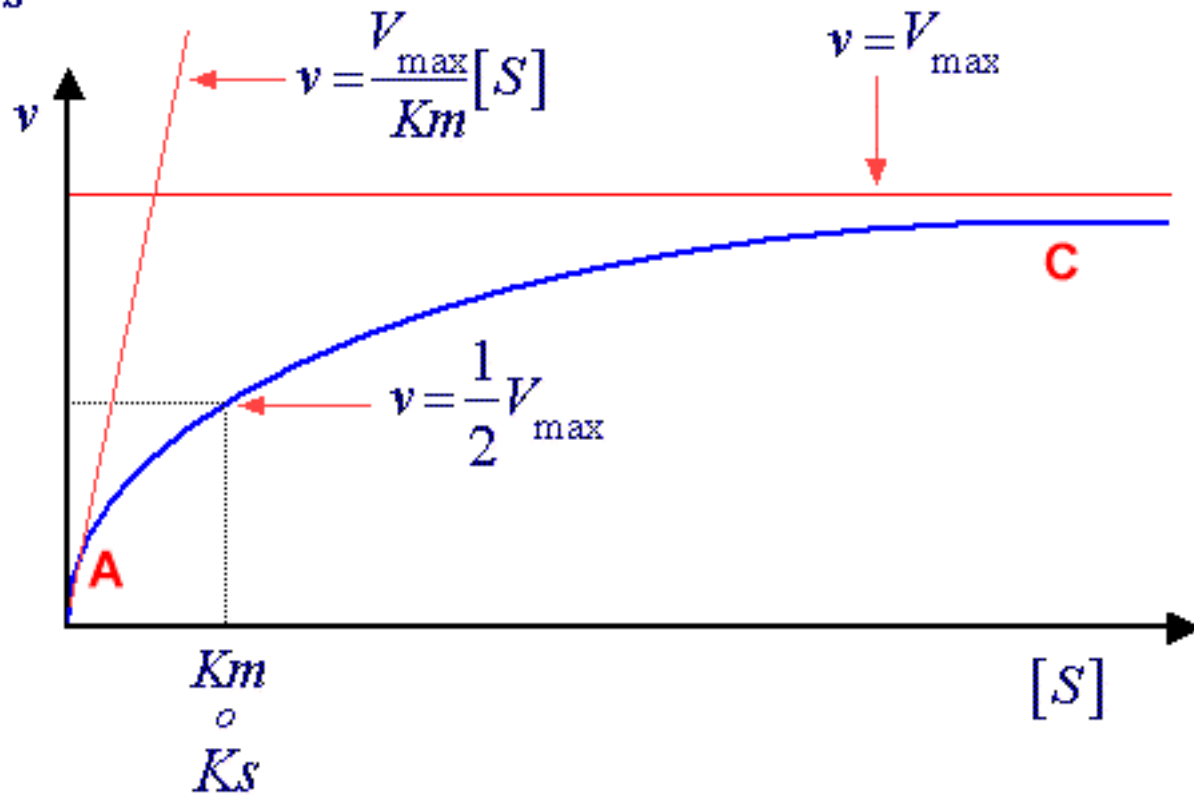


Dosaggio enzimatico

1. Dosare l'attività di un enzima, cioè la velocità di una reazione catalizzata da un enzima
2. Dosare la quantità di un substrato che prende parte ad una reazione catalizzata da un enzima

Cinetica enzimatica

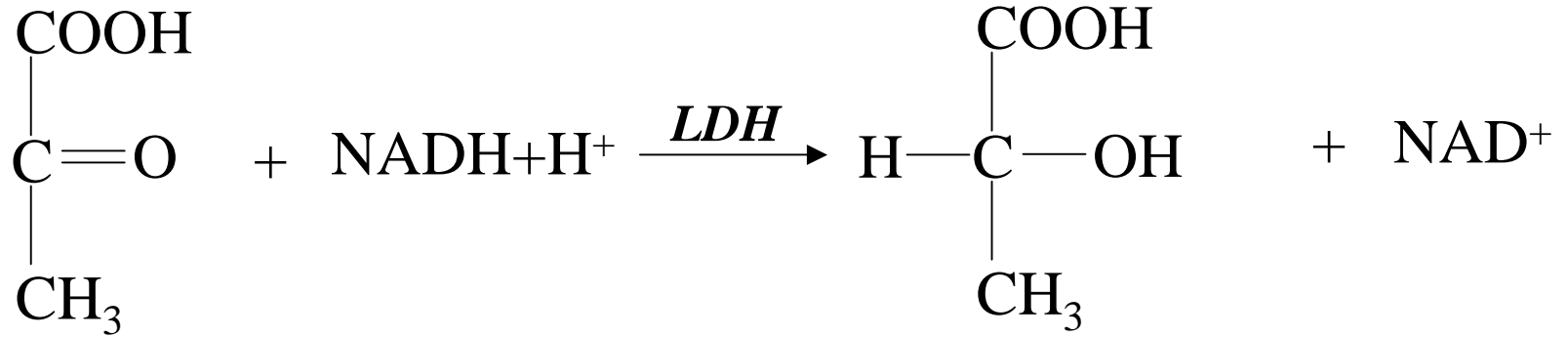
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m}$$



- L'equazione cinetica è di 1°ordine nei confronti dell'enzima totale:

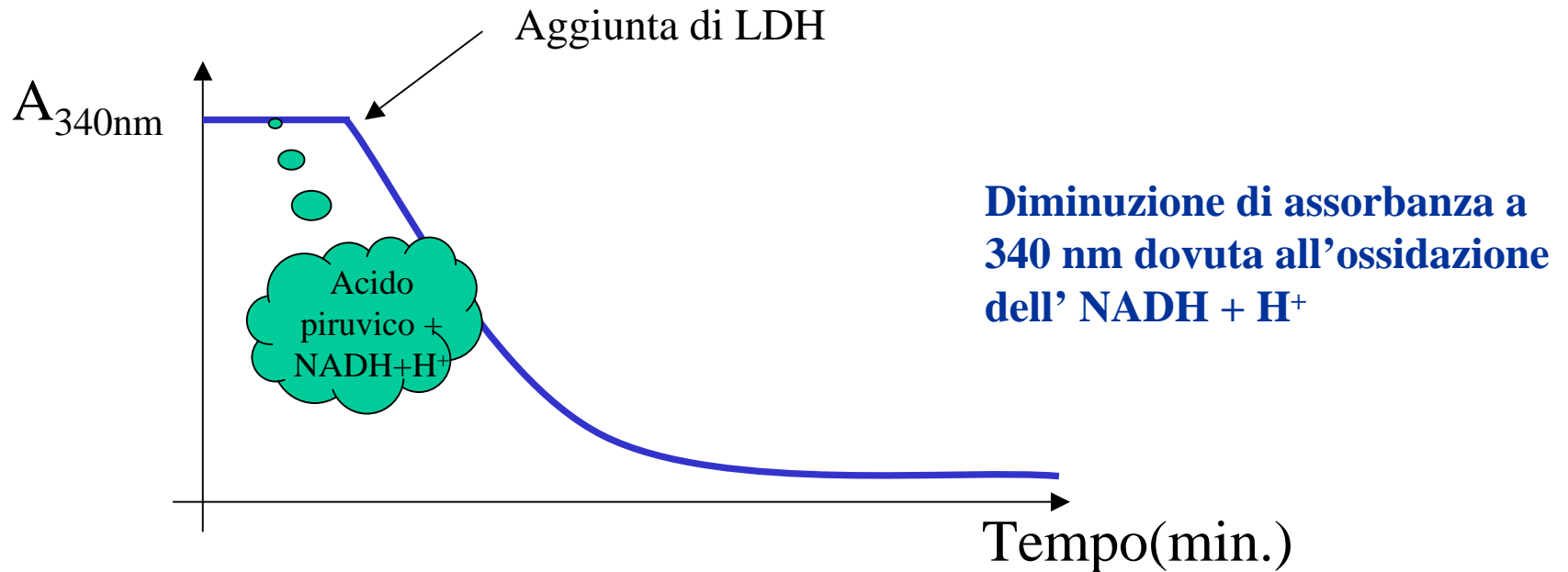
$$v = \frac{[S]}{K_m + [S]} k_3 [E_{tot}]$$

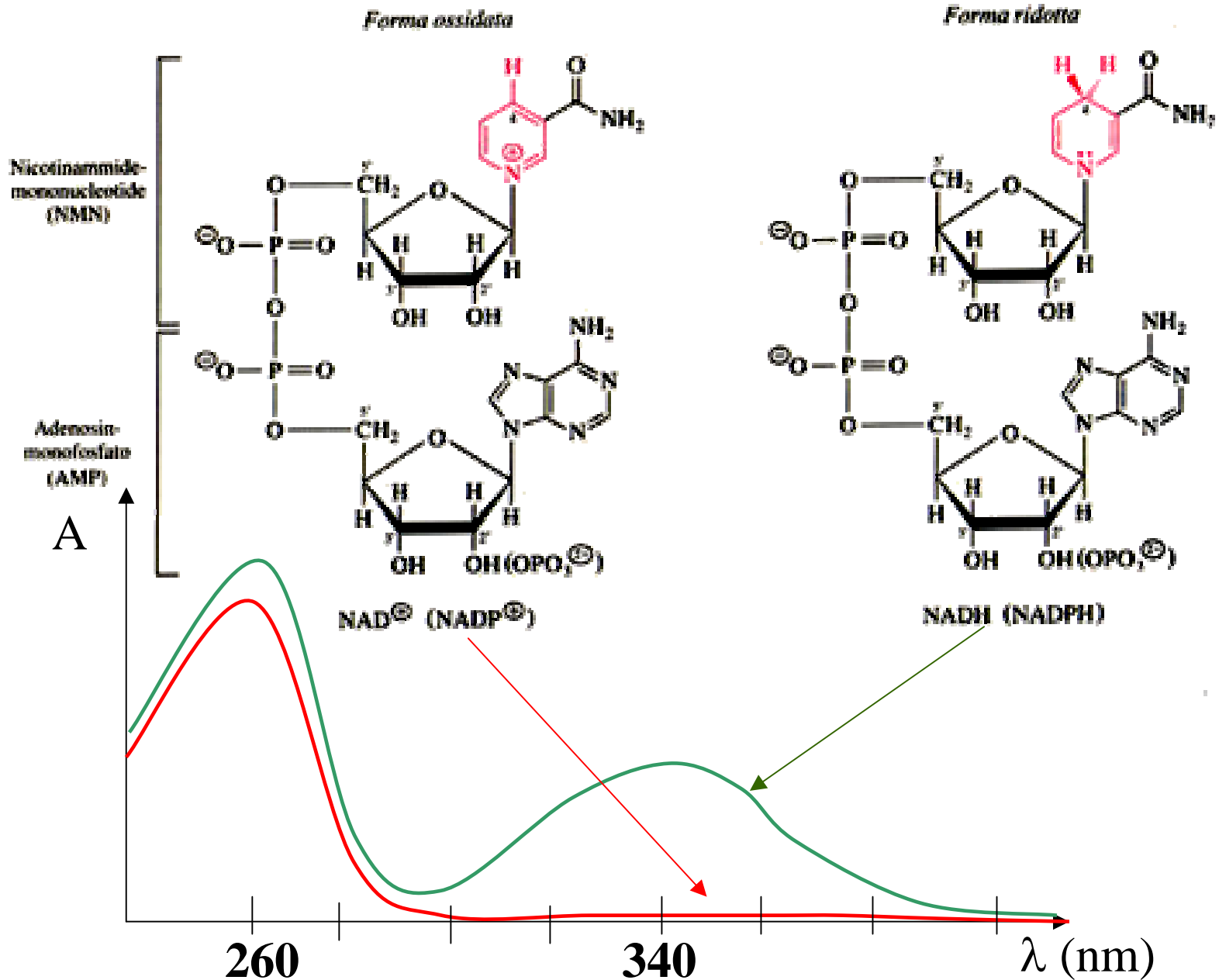
La velocità di una reazione catalizzata da un enzima non si esprime né in termini di unità di massa (g, Kg. ecc) né in termini di unità di concentrazione (M, mM, ecc) ma in termini di unità di velocità della reazione catalizzata dall'enzima



Acido piruvico

Acido lattico



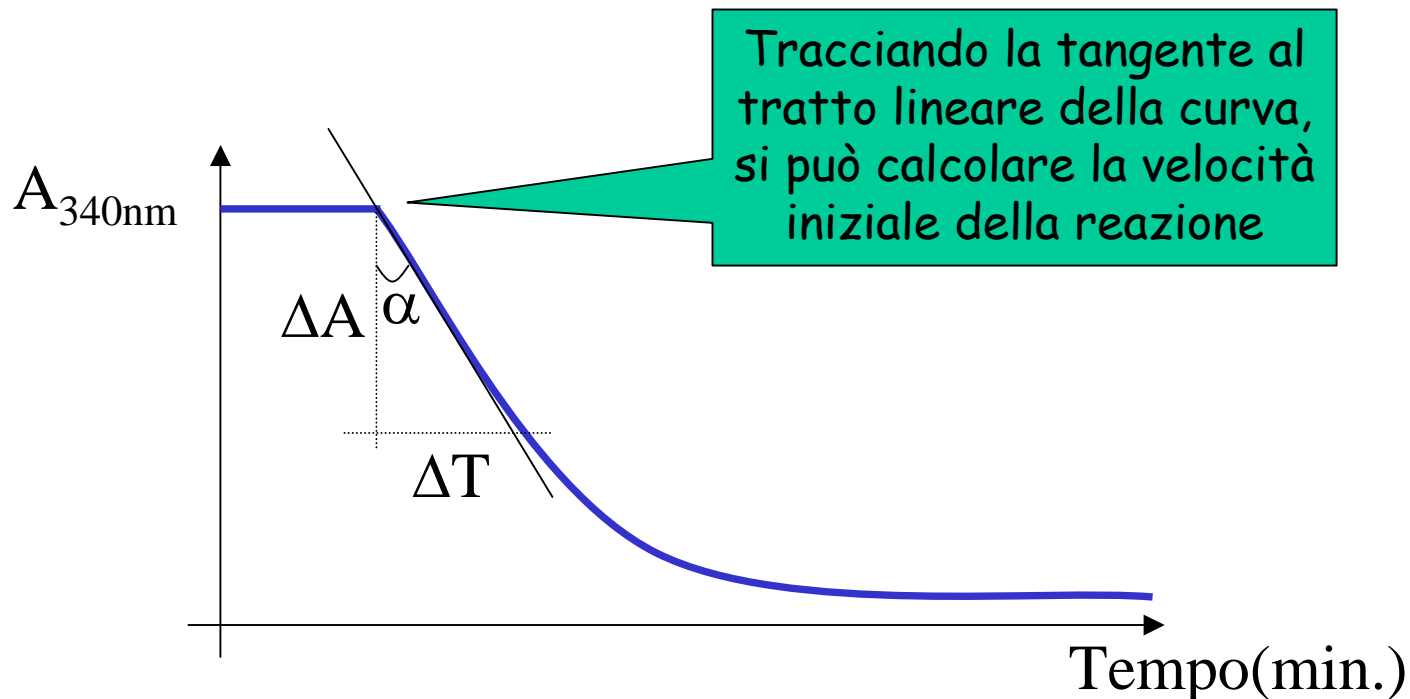


Per dosare l'attività della LDH si misura la velocità iniziale della reazione catalizzata dall'enzima per concentrazioni di piruvato (substrato) saturanti. In queste condizioni la velocità $V_0 = K_3[Et]$

$$V = \frac{\Delta C}{\Delta T} \quad A = \epsilon l c \quad \frac{\Delta A}{\Delta T} = \epsilon l \frac{\Delta C}{\Delta T} \quad \frac{\Delta A}{\Delta T} = \epsilon l V$$

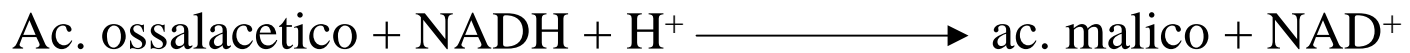
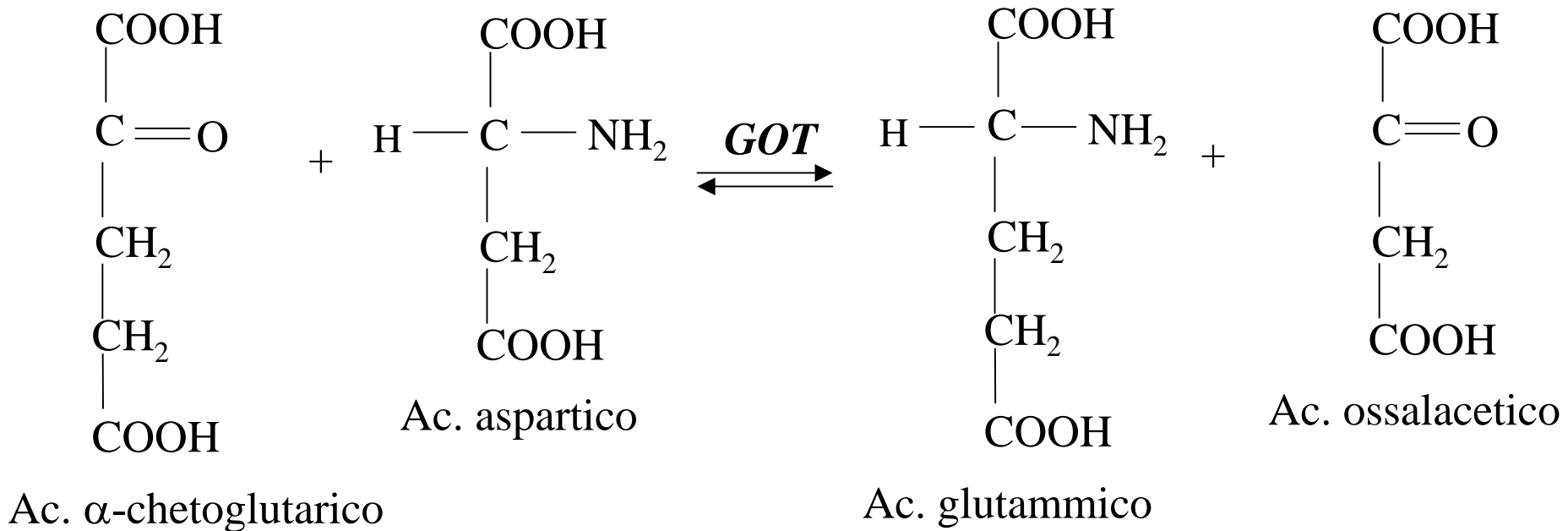
$$V = \frac{\Delta A / \Delta T}{\epsilon l}$$

La variazione di assorbanza nel tempo si ottiene tracciando una tangente al primo tratto lineare della curva sperimentale: $\text{tg}\alpha = \Delta A / \Delta T$



Dosaggi enzimatici mediante reazioni accoppiate

[dosaggio dell'enzima *glutammico ossalacetico transaminasi (GOT)*]



Attività enzimatica: viene di solito espressa in unità che indicano le μ moli di substrato trasformate in un minuto in determinate condizioni di dosaggio

Unità di attività enzimatica (U.E.): È l'attività che catalizza la trasformazione di una μ mole di substrato in un minuto

Attività specifica: Attività totale dell'enzima diviso il contenuto proteico totale del campione biologico (μ moli di substrato trasformate/ minuto \times mg proteine)

Katal (Kat): È l'attività enzimatica che catalizza la trasformazione di una mole di substrato in un secondo

Isoenzimi

- Sono le forme multiple dovute a differenze, determinate geneticamente, di struttura primaria
- Sono anche isoenzimi quelle proteine che svolgono la stessa funzione ma sono geneticamente indipendenti, per esempio:
- EC 1.1.1.37 malato deidrogenasi
 - Citosolica (codificata dal DNA nucleare)
 - Mitocondriale (codificata dal DNA mitocondriale)

Transaminasi

- **Alanina aminotransferasi ALT** (Sinonimo **GPT**) (10-25 u\l):
- Localizzato principalmente nelle **cellule epatiche** → fuoriesce per danni a carico della membrana cellulare
- Abbastanza specifico per un danno epatico → non ne chiarisce la causa.
- Farmaci (barbiturici, il fenobarbital, i glucocorticoidi, l'acetaminofene, il tiacetarsamide ed altri) → innalzamento dell'ALT.

catalizza la reazione reversibile:



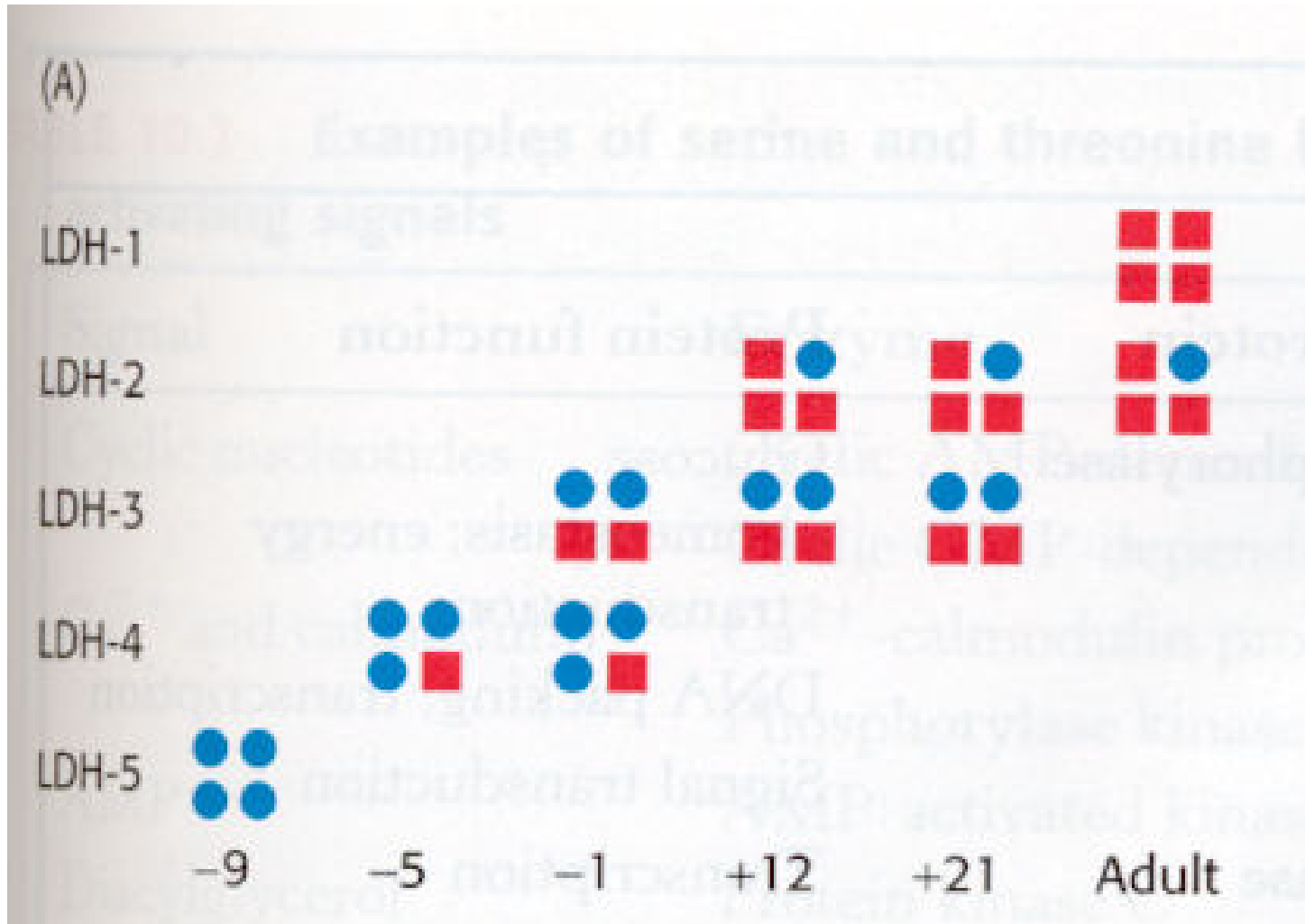
Transaminasi

- **Aspartato aminotransferasi AST** (Sinonimo **GOT**) (8-20 u\l) :
- E' contenuto in diverse cellule ma risulta particolarmente concentrato in **cellule epatiche** e nel **tessuto muscolare**.
- Localizzato nei **mitocondri** →
 - rilascio più lento nel sangue
 - danno più grave
- Falsi positivi:
 - Emolisi
 - lipemia alta

catalizza la reazione reversibile:



Lattico deidrogenasi (LDH)



Lattico deidrogenasi (LDH)

- (120-240 U\L)
- Presente nella maggior parte dei tessuti e in concentrazione più elevata nel cuore, fegato, muscolo scheletrico, rene, eritrociti.
- Diversi isoenzimi:
 - M4 (LDH5) → muscoli e fegato
 - H4 (LDH1) → cuore
 - H3M1 (LDH2) → eritrociti (concentrazione 150-200 volte più alta rispetto al plasma → emolisi)
- Valori elevati:
 - IMA
 - anemie emolitiche, anemia perniziosa;
 - leucemie;
 - malattie muscolari (es. distrofia muscolare);
 - malattie epatiche

Catalizza la trasformazione dell'acido piruvico in acido lattico.

Lattico deidrogenasi: formato dall'associazione di quattro subunità di due differenti tipi

H (cuore)

M (muscolo)

(B)

	Heart	Kidney	Red blood cell	Brain	Leukocyte	Muscle	Liver
H ₄	■	■	■	■	■	—	—
H ₃ M	■	■	■	■	■	—	—
H ₂ M ₂	—	■	—	■	■	■	—
HM ₃	—	—	—	—	■	—	—
M ₄	—	—	—	—	—	■	■

Creatina fosfochinasi (CPK)

- VN: (50\100 mU\ml)
- Enzima deputato al metabolismo muscolare è presente nel cuore e nei muscoli → produzione di ATP a partire dalla fosfocreatina
- 3 isoenzimi:
 - MM → muscolare
 - MB → cardiaco
 - BB → cerebrale
- Cause di aumento:
 - IMA → isoenzima MB
 - ↑ dopo 5 - 6 ore dall'attacco → 600 - 700 mU / litro dopo 24 ore.
 - in assenza di ulteriori ischemia miocardica ritorna a livelli normali dopo circa 72 - 96 ore.
 - Patologie muscolari
 - Affaticamento muscolare.

Fosfatasi alcalina ed acida

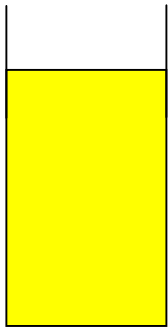
- Fosfatasi alcalina (ALP)
 - Prodotta da:
 - tessuto osseo
 - fegato e intestino
 - VN
 - Bambini → 100-600 mU
 - Adulti → 75\220 mU\L
- Fosfatasi Acida
 - Prodotta da:
 - Prostata
 - Fegato
 - Milza
 - VN
 - Uomo 2.5\12 U\L
 - Donna 0.3\9.5 U\L

Dosaggio di substrato

Il dosaggio enzimatico può essere utilizzato anche per determinare la concentrazione di substrato

Determinazione della quantità di piruvato presente in un campione biologico

- 10 μ l NADH 20 mM (Ci)



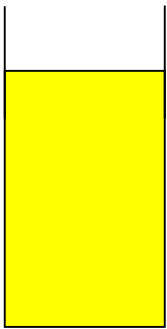
2 ml di soluzione tampone

- Cf NADH = 100 μ M

Sapendo che l' ϵ dell' NADH a 340 nm è di $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

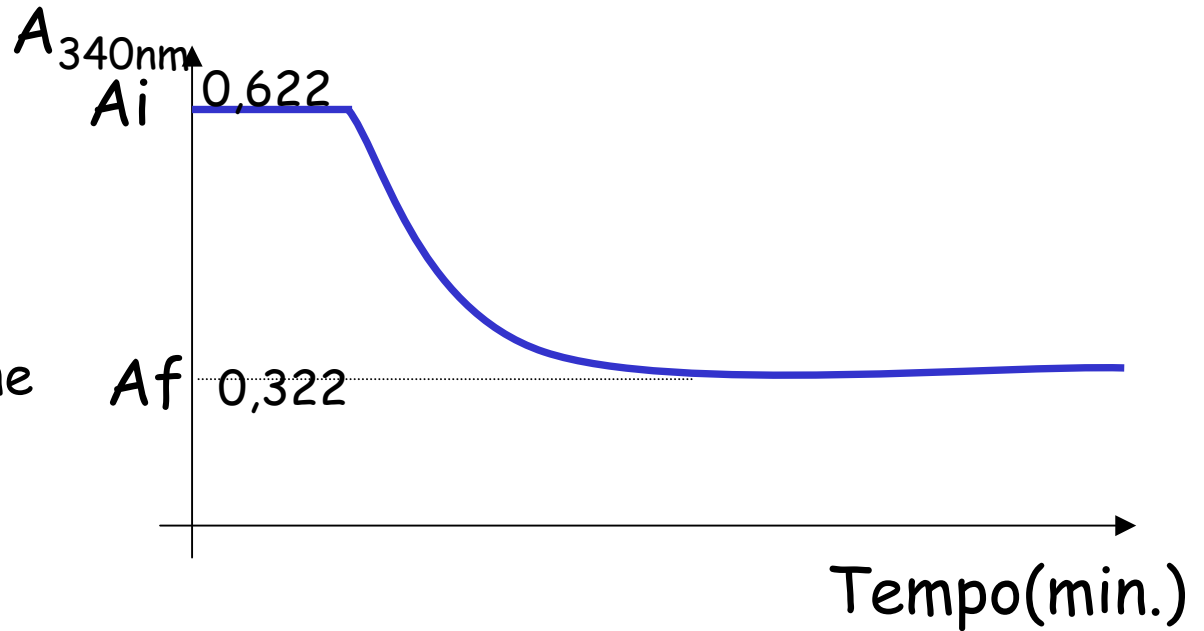
0,1 mM NADH avrà un'assorbanza di 0,622 (A_i)

• Cf $\text{NADH} = 100 \mu\text{M}$



2 ml di soluzione tampone

- 10 μl Piruvato (C_x)
- 10 μl LDH



$$\Delta A = \epsilon l \Delta C$$

$$\Delta A = A_f - A_i = 0,3$$

$$\Delta C = \Delta A / \epsilon l = 0,3 / 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \cancel{\text{cm}^{-1}} \times \cancel{\text{cm}} = 0,048 \text{ mM}$$

—————→ 48 μM

Le μmoli di piruvato nei 2 ml della cuvetta saranno uguali a

$$\frac{\Delta A}{\epsilon l} \times V_1 \longrightarrow \frac{48 \mu\text{M} \times 2 \text{ ml}}{1000} = 0,096 \mu\text{moli}$$

$$[\text{piruvato}] = \frac{0,096}{V \text{ piruvato (0,01 ml)}} = 9,6 \text{ mM}$$