



Enzimologie clinica



Semnificatia diagnostica a enzimelor

- 1) Enzimele pot fi markeri diagnostici pentru diferite afectiuni.
- 2) Enzimele pot fi utilizate ca si reactivi pentru determinari biochimice variate.
- 3) Enzimele pot servi ca mijloc terapeutic.

Enzimele ca markeri diagnostici

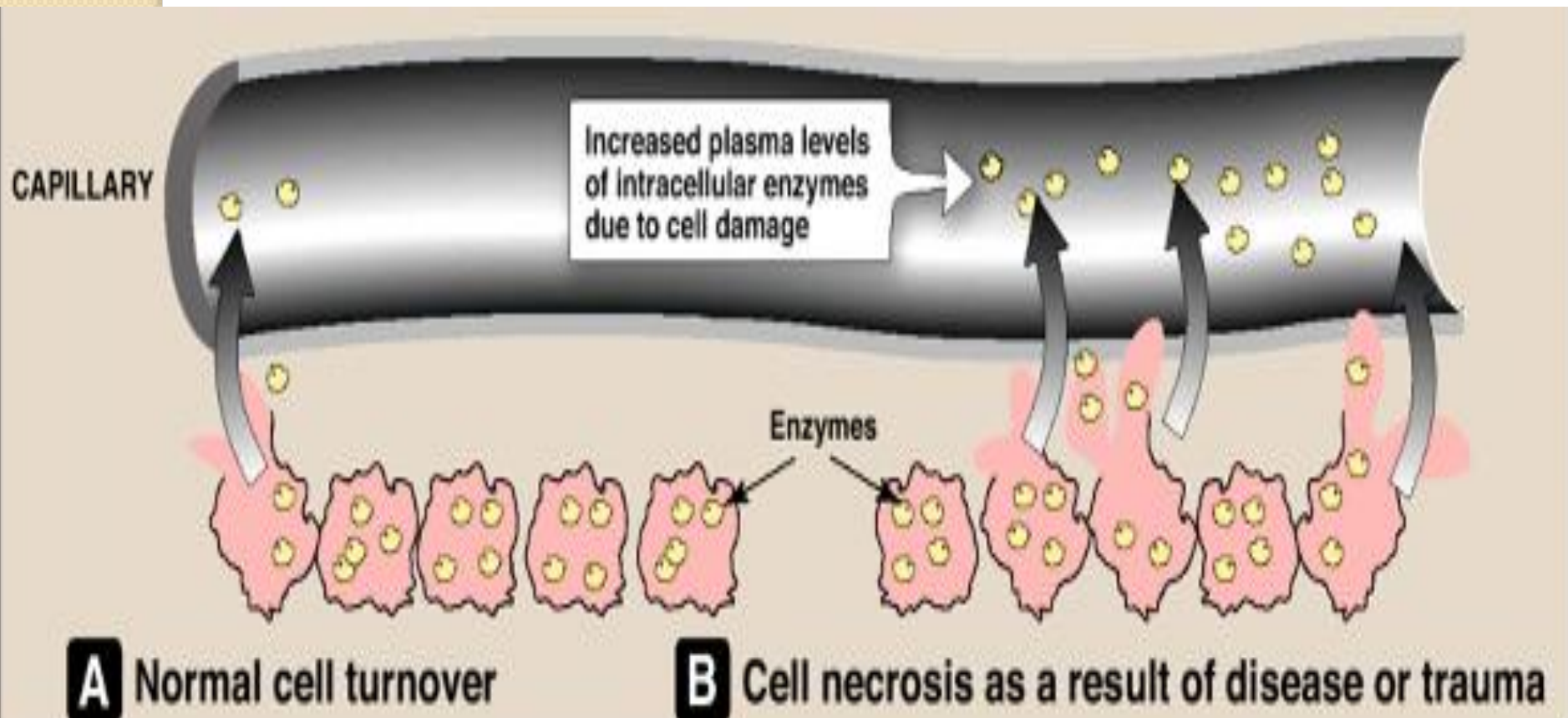
1) Enzime functionale plasmatice(enzime derivate din plasma)- Anumite proenzime sau enzime sunt prezente in permanenta in circulatia indivizilor sanatosi si au rol fiziologic in sange.

Cateva **exemple** includ lipoproteinlipaza, pseudocolinesteraza, dar si enzimele si proenzimele responsabile de coagulare (ex. trombina) si fibrinoliza (ex. plasmina); majoritatea acestor enzime sunt sintetizate in si excretate de ficat.

2) Enzime nefunctionale plasmatice (Enzime celulare): plasma contine de asemenea si numeroase alte enzime care nu au rol functional plasmatic. Acestea provin din apoptoza eritrocitelor, leucocitelor sau altor tipuri celulare.

Enzimele ca markeri diagnostici

- Lezarea celulara sau necroza tisulara este insotita de cresterea nivelurilor acestor enzime nefunctionale plasmatice.



Mecanisme posibile pentru cresterea valorilor plasmatiche ale acestor enzime

A) **Cresterea eliberarii**

- i. **Necroza celulara**
- ii. **Cresterea permeabilitatii membranei celulare**
- iii. **Cresterea productiei celulare intrinseci**
- iv. **Cresterea sursei enzimaticice tisulare**

B) **Scaderea eliminarii**

- i. **Icter mecanic**
- ii. **Insuficienta renala**



Scaderea nivelurilor plasmaticice

A. **Productie scazuta**

i. **Genetica**

ii. **Dobandita**

B. **Inhibitie enzimatica**

C. **Absenta cofactorilor**

Unitati de masura pentru activitatea enzimelor plasmatiche

Unitatea internationala – reprezinta activitatea unei enzime care transforma un micromol de substanta pe minut in produs de reactie in conditii optime de temperatura si pH. Se exprima in U/l.

1 unitate de activitate enzimatica (U) = 1 micromol pe min.

Katalul – unitatea catalitica – reprezinta numarul de moli de substanta dintr-un litru transformati intr-o secunda. Se abreviaza cu kat sau k.

$$60 \text{ U} = 1 \text{ mkat}$$



Semnificatia clinica a dozarilor enzimaticice

Determinarea singulara sau seriata a activitatii enzimaticice pentru o anumita enzima:

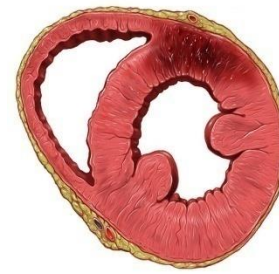
- 1) Ajuta in stabilirea diagnosticului pozitiv/diferential pentru o anumita afectiune;
- 2) Ajuta la stabilirea raspunsului terapeutic;
- 3) Ajuta la stabilirea prognosticului pentru o anumita afectiune.

Markeri diagnostici enzimatici

Determinările enzimatică sunt utile în cazul următoarelor afecțiuni:

- 1) Infarctul **M**iocardic **A**cut
- 2) Afecțiuni hepatice
- 3) Afecțiuni musculare
- 4) Afecțiuni osoase
- 5) Neoplazii
- 6) Afecțiuni ale tractului gastro-intestinal

Diagnosticul IMA



- Criteriile OMS de diagnostic pentru IMA sunt reprezentate de durerea precordială, modificările EKG și creșterea markerilor biochimici caracteristici pentru injuria miocardică.
- Jumătate dintre pacienții cu simptomatologie "tipică" nu au IMA.
- EKG este o metodă specifică pentru IMA, dar nu foarte sensibilă.
- În contrast cu aceasta, markerii biochimici prezintă sensibilitatea necesară unui diagnostic corect al IMA.
- Acuratetea diagnosticului crește prin combinarea celor mai specifice și mai sensibile dintre testele diagnostice existente.

Enzimele serice in IMA

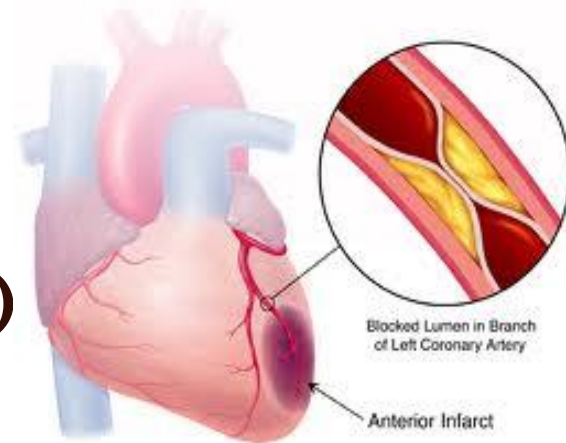
Determinarile enzimatice efectuate de rutina pentru diagnosticul IMA sunt:

1) Creatin Fosfo Kinaza (CPK, CK);

2) Aspartat amino transferaza (AST)

3) Lactat dehidrogenaza (LDH).

Markeri biochimici acceptati pentru afectarea ischemica a miocardului includ: **mioglobina, CK-MB, CK totala, si troponinele cardiace T si I.**



I) Creatin Kinaza (CK, CPK)

- Este o enzima care se gaseste la nivelul muschiului cardiac si muschilor scheletici, intr-o cantitate mai redusa la nivelul creierului si deloc la nivel hepatic sau renal.



- **Catalizeaza transferul gruparii fosfat intre creatina si ATP/ADP;**
- **Ofera posibilitatea regenerarii rapide a ATP cand nivelul acestuia scade;**
- **Creatin fosfatul se regenereaza atunci cand cantitatea de ATP creste.**

Creatin Kinaza (CK, CPK)

- **Dupa IMA** – valorile serice cresc dupa 3-6 ore, ating un maxim dupa 24-30 de ore si revin la normal in 2-4 zile (de regula in 72 de ore).
- **Valoarea normala** – variaza intre 10-50 UI/l la 37°C.
- CK este un **indicator sensibil** pentru stadiile timpurii ale ischemiei miocardice.
- Valoarea nu este modificata in insuficienta cardiaca sau insuficienta coronariana.
- In IMA, CPK creste si revine mai rapid la normal decat GOT.

Izoenzimele CK/CPK

- Are trei izoenzime;
- Fiecare izoenzima este un dimer compus din doi protomeri 'M' (Muscles) and 'B' (Brain).
- Aceste izoenzime pot fi separate prin electroforeza sau cromatografie schimbatoare de ioni.

Isoenzyme	Electrophoretic mobility	Tissue of origin	Mean percentage in blood
MM(CK3)	Least	Skeletal muscle Heart muscle	97-100%
MB(CK2)	Intermediate	Heart muscle	0-3%
BB(CK1)	Maximum	Brain	0%

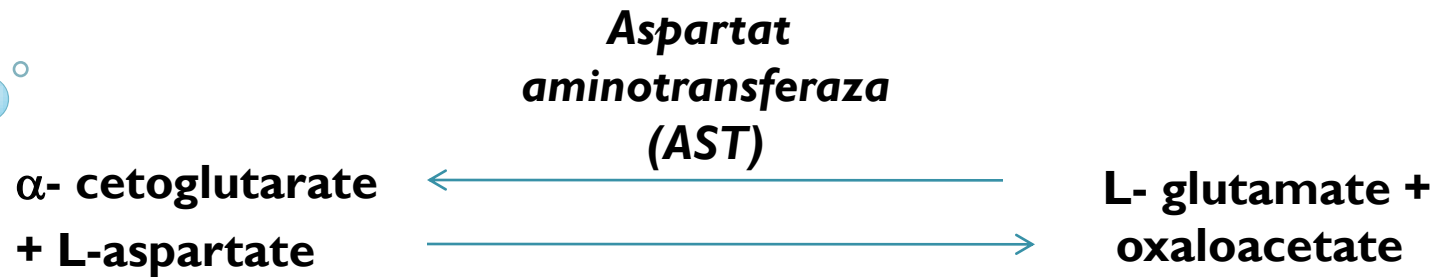
Izoenzimele CK/CPK

- Valorile plasmaticice ale CK/CPK sunt majoritar MM, de la nivelul muschilor scheletici;
- In cazul IMA, nivelurile crescute ale CK/CPK sunt reprezentate de aproximativ 50% CK MM si aproximativ 50% CK MB.
- Miocardul este singurul tesut care contine mai mult de 5% din activitatea CK totale ca si izoenzima CK MB
- **Dupa un atac de IMA, aceasta izoenzima creste la cca 4 ore de la instalarea durerii preordiale, atinge un varf la aproximativ 24 de ore si scade rapid.**
- In cazul IMA, CK MB reprezinta 6- 20 % din valoarea activitatii plasmaticice a CK totale, aceasta fiind crescuta de 20x fata de normal.

CK- BB

1. Trauma si chirurgia cerebrala;
2. Injuria muschilor netezi (ex. Ischemia intestinala);
3. Pacientii cu neoplazii: ex. Cancerul de prostata, cancerul pulmonar cu celule mici, cancer de tract intestinal (se sintetizeaza subunitatea B);
4. Creste tranzitoriu dupa stopul cardiac → reflecta ischemia cerebrala.

2) Aspartat amino transferaza (AST)



- = Transaminaza glutamil oxalil acetica (GOT).
- Nivelul creste semnificativ in cazul IMA;
- **Valoare normala-** 0-41 UI/l at 37°C;
- **In IMA** – activitatea serica creste in primele 12 ore, atinge un varf la 24 de ore si revine la normal in 3-5 zile;
- Cresterea depinde de extinderea infarctului. Reinfarctizarea determina cresterea secundara a GOT.

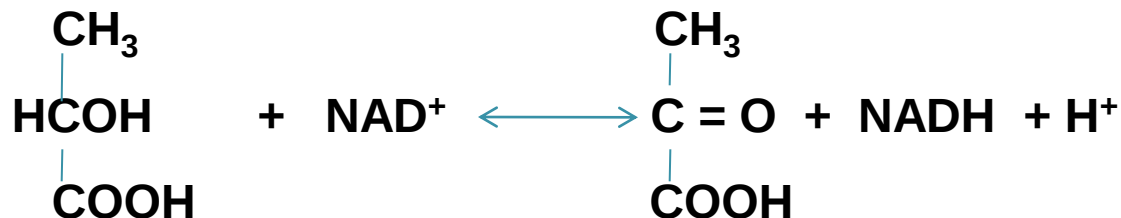
Aspartat amino transferaza (AST)

Semnificatie prognostica:

- > 350 UI/l = infarct masiv (fatal);
- > 150 UI/l se asociaza cu mortalitate inalta;
- < 50 UI/l se asociaza cu mortalitate redusa.

Alte afectiuni - Cresterea activitatii se poate observa si in afectiunile hepatice sau musculare. Diferentierea cu acestea se poate realiza prin alte determinari enzimaticice care nu caracterizeaza IMA.

3) Lactat dehidrogenaza (LDH)



- Lactat dehidrogenaza catalizeaza conversia reversibila a piruvatului in lactat;
- **Valorile normale** - 55-140 UI/l la 37°C. Valorile apropiate de valoare maximala sunt in general intalnite in cazul copiilor.
- Nivelurile LDH sunt de 100x mai ridicate in hematii decat la nivelul plasmei, de aceea o hemoliza minora poate determina un rezultat fals pozitiv.

Lactat dehidrogenaza (LDH)

- **In IMA** – Nivelul plasmatic crește după 12-24 de ore, atinge un vârf după 48 de ore, atingând valori de 1000 UI/l cu revenire treptată la normal după 8-14 zile.
- Nivelul creșterii este proporțional cu extinderea infarctului miocardic.
- Valorile crescute ale LDH persistă cu mai mult de 1 săptămână după ce nivelurile CPK și GOT au revenit la normal.

Lactat dehidrogenaza (LDH)

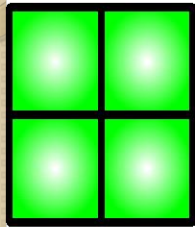
- ° **Alte afectiuni** – Cresterea activitatii serice a LDH poate fi intalnita si in cazul anemiilor hemolitice, distrugere hepatocelulara, distrofii musculare, carcinoame, leucemii sau orice alta afectiune care determina necroza celulara.

Cresterea nespecifica a valorilor LDH in cazul acestor afectiuni face ca studiul izoenzimelor sale sa aiba mai multa semnificatie clinica.

Izoenzimele LDH

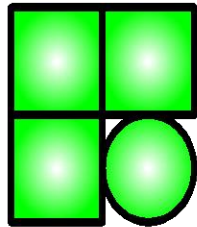
- LDH este un tetramer cu 4 subunitati.
- Subunitatile sunt lanturi polipeptidice fie de tip H (Heart) sau M (Muscle).
- Aceste doua lanturi sunt sintetizate de doua gene diferite.
- Chiar daca amandoua au aceeasi greutate moleculara, exista mici variatii in ceea ce priveste aminoacizii constituenti.
- Sunt posibile 5 combinatii diferite: H₄, H₃M₁, H₂M₂, H₁M₃, M₄.

Izoenzimele LDH



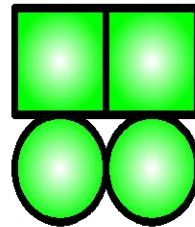
LDH₁

H₄



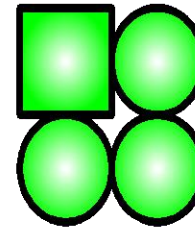
LDH₂

H₃M₁



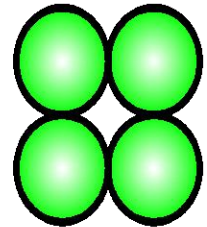
LDH₃

H₂M₂



LDH₄

H₁M₃

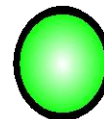


LDH₅

M₄



H subunit



M subunit

Izoenzimele LDH

No. of Isoenzyme	Subunit make up of isoenzyme	Electrophoretic mobility at pH8.6	Activity at 60°for 30 minutes	Tissue origin	Percentage in human serum (Mean)
LDH-1	H4	Fastest	Not destroyed	Heart muscle	30%
LDH-2	H3M1	Faster	Not destroyed.	RBC	35%
LDH-3	H2M2	Fast	Partly destroyed	Brain	20%
LDH-4	H1M3	Slow	Destroyed	Liver	10%
LDH-5	M4	Slowest	Destroyed	Skeletal Muscles	5%

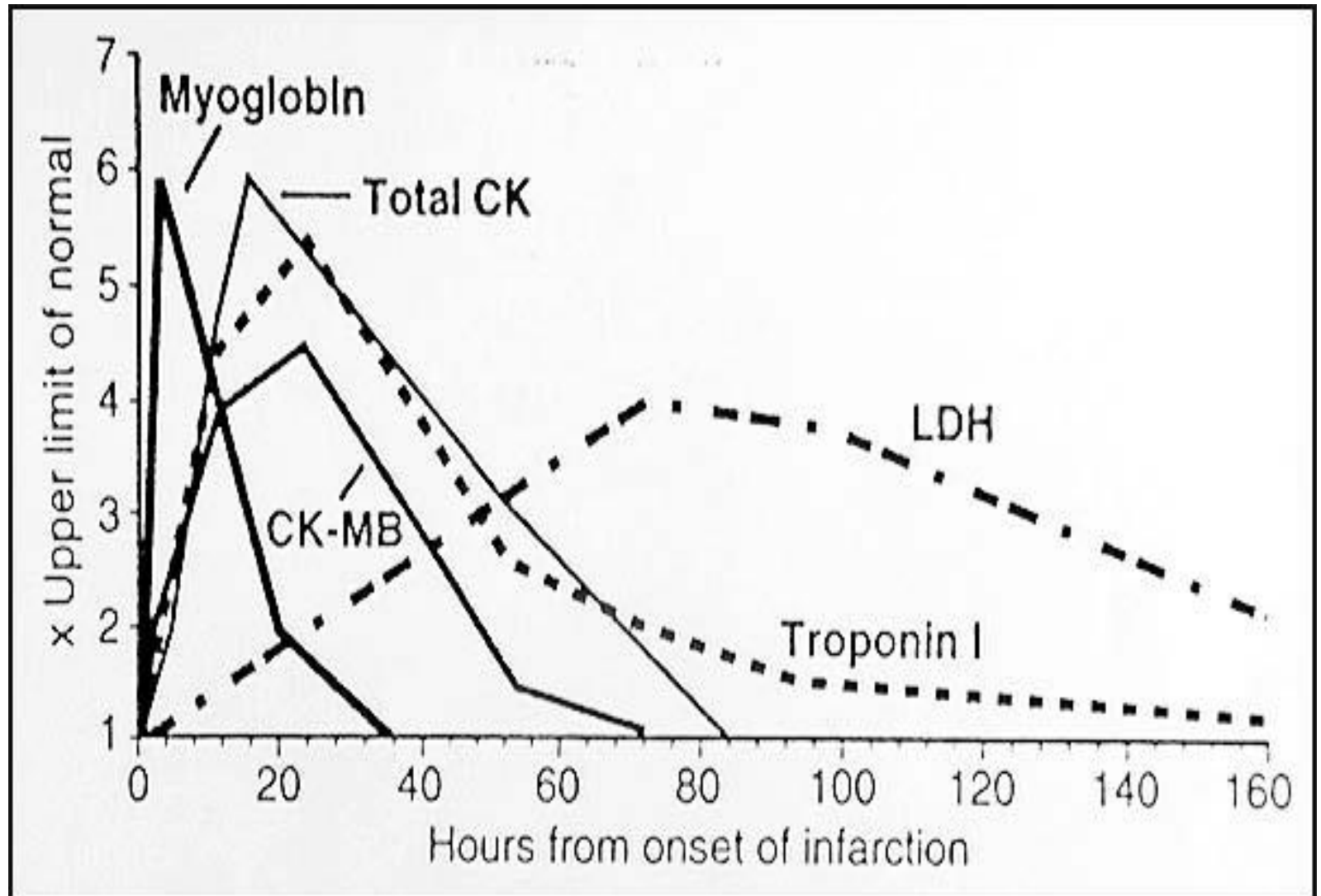
In mod normal nivelurile plasmaticice ale LDH- 2(H3M1) sunt superioare celor de LDH-1, acest tipar fiind inasa inversat in cazul IMA - "pattern inversat".

4) Troponinele cardiace

- Sunt de asemenea markeri pentru IMA;
- Complexul troponinelor consta in 3 componente distincte: **Troponina C (Calcium binding), Troponina I (Actomyosin ATPase inhibitory element), and Troponina T (Tropomyosin binding element).**
- **Troponina I** este eliberata in circulatie dupa 4 ore de la instalarea manifestarilor cardiace, cu un varf al concentratiei la 14-24 de ore, ramanand crescuta timp de 3-5 zile postinfarct.
- Nivelurile serice ale **TnT cresc in primele 6 ore de la infarctul miocardic, ating un maxim la 72 de ore si raman crescute pana la 7-10 zile.**
- Estimarea TnI este un indice cu sensibilitate 100% pentru IMA.

5) Mioglobina ca marker cardiac

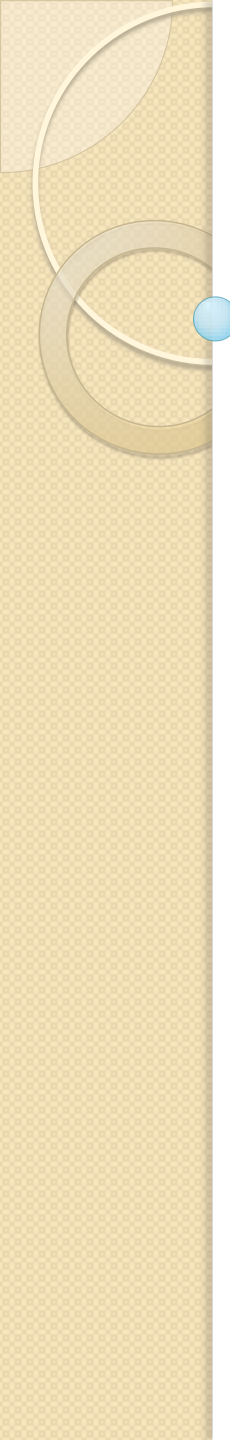
Unul dintre markerii timpurii de infarct miocardic este mioglobina, care este o determinare foarte sensibilă, dar careia îi lipsește în anumite condiții clinice, specificitatea. Nivelurile ei cresc la 4 ore de la infarct, dar rezultate fals pozitive pot fi întâlnite la pacienții cu insuficiență renală sau traumatisme musculare.



Enzime serice in afectiunile hepatice

Testele enzimaticice pot fi grupate in doua mari categorii:

- (1) Enzime a caror crestere plasmatica reflecta afectarea hepatocitelor
- (2) Enzime a caror crestere plasmatica reflecta colestaza



(I) Enzime a caror crestere serica reflecta afectarea hepatocitelor

Aminotransferazele (transaminazele) sunt indicatori sensibili pentru afectarea hepatocitara și ajuta la recunoastrea afectarii hepatocitare acute (ex.hepatitele). Acestea sunt:

- 1) Aspartat aminotransferaza (AST)
- 2) Alanin aminotransferaza (ALT).

Amino Transferazele

- **AST** se gaseste la nivel hepatic, miocard, muschi scheletic, rinichi, pancreas, plaman, leucocite si eritrocite (in ordinea descrescatoare a concentratiilor).
- **Valori normale - 0-41 UI/l**
- **ALT** se gaseste predominant la nivel hepatic.
- **Valori normale - 0-45 UI/l**
- Aminotransferazele sunt prezente in mod normal in plasma in concentratii mici. Cresterea permeabilitatii membranei celulare hepatocitare determina eliberarea unor cantitati mai mari in circulatie.

Semnificatia diagnostica a aminotransferazelor

- Valori inferioare celei de **300 UI/l** nu sunt specifice si pot fi intalnite in orice tip de afectare hepatica;
- Cresteri mari ale valorilor, ca de ex **> 1000 UI/l** – se intalnesc aproape **exclusiv in afectiuni asociate cu afectare hepatocelulara extinsa**, precum (1) **hepatite virale**, (2) **ischemie hepatica (hipotensiune prelungita sau insuficienta cardiaca acuta)**, sau (3) **afectare hepatica indusa toxic sau medicamentos**;
- In majoritatea afectiunilor hepatocelulare ALT este mai mare sau egal cu AST;
- Un raport **AST:ALT > 2:1** este sugestiv, iar un raport de **3:1** este inalt sugestiv pentru boala hepatica alcoolica;
- In icterul mecanic valoarea aminotransferazelor nu este in general mult crescuta.

(2) Enzime a caror crestere plasmatica reflecta colestaza

- Activitatea a trei enzime -

- 1) Fosfataza alcalina,**

- 2) 5'-nucleotidaza, si**

- 3) γ -Glutamil transpeptidaza (GGT) – este de regula crescuta in colestaza.**

Fosfataza alcalina si 5'-nucleotidaza se gasesc in sau in vecinatatea polului biliar al hepatocitelor, in timp ce GGT este localizat la nivelul celulelor epiteliale ale canaliculelor biliare.

Fosfataza alcalina in afectiunile hepatice

- Valoarea normala a fosfatazei alcaline serice este data de o serie de izoenzime de la nivelul ficatului, osului, placentei si mai putin comun de la nivelul intestinului subtire.

Variatii fiziologice

- Pacientii cu varsta peste 60 de ani pot prezenta cresteri modice ale fosfatazei alcaline serice.
- Este de asemenea comun intalnita aceasta crestere la copiii sau adolescentii cu crestere osoasa rapida, pe seama fosfatazei alcaline osoase sau la finalul sarcinii pe seama influxului de fosfataza alcalina placentara.

Fosfataza alcalina in afectiunile hepatice

Variatii patologice

- Cresterea fosfatazei alcaline hepatice nu este in totalitate specifica pentru colestaza, iar o crestere de mai putin de trei ori valoarea normala poate fi intalnita in aproape orice afectiune hepatica.
- Cresteri ale valorilor fosfatazei alcaline de peste 4x valoarea normala se intalnesc la pacientii cu afectiuni colestatice sau infiltrative de tipul cancerului sau amiloidozei.

Fosfataza alcalina in afectiunile hepatice

- In cazul afectiunilor hepatice, cresterea este datorata aproape in exclusivitate izoenzimei hepatice.
- In absenta icterului sau a valorilor crescute ale transaminazelor, o valoare crescuta a fosfatazei alcaline sugereaza frecvent (dar nu neaparat) stadii timpurii ale colestazei, sau, mai rar, infiltrare hepatica tumorală sau granulomatoasă.
- **Colestaza intrahepatica** – valorile plasmatice sunt crescute in cazul hepatitelor toxice, ciroza biliară primară, rejectia de transplant hepatic sau steatonecroza alcoolică.
- **Colestaza extrahepatica** - valori foarte crescute se regasesc in icterul mecanic din neoplazii, litiaza biliară, colangita sclerozanta, etc.
- Valorile plasmatice ale fosfatazei alcaline nu pot face diferenta dintre colestaza intra- sau extrahepatica.

Izoenzimele fosfatazei alcaline

- ° **Izoenzima hepatica** – migreaza cel mai rapid catre anod in aceeasi regiune ca si α_2 globulinele. Creste in obstructia biliara extrahepatica;
- **Izoenzima osoasa** – este in mod normal crescuta la copii in perioada de crestere si se datoreaza activitatii osteoblastice;
- **Izoenzima placentara** - creste in timpul ultimelor 6 saptamani de sarcina;
- **Izoenzima intestinala** – creste dupa pranzurile bogate in lipide sau in cazul unor variate afectiuni intestinale.

Izoenzimele fosfatazei alcaline

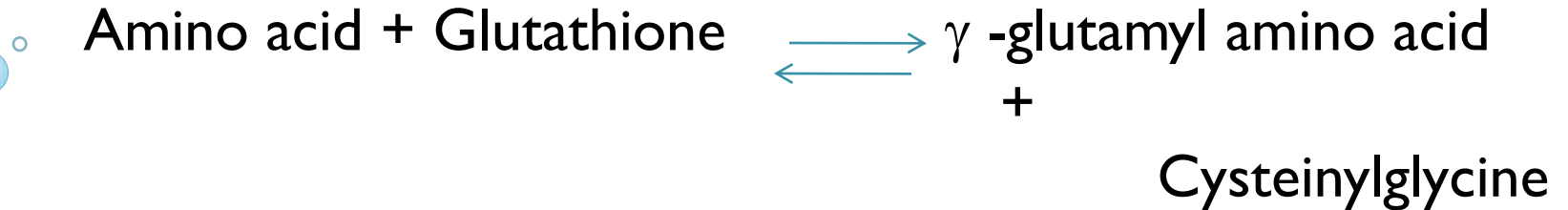
Izoenzima Regan –

- Prezenta in plasma a cca 15% dintre pacientii cu cancer pulmonar, hepatic sau intestinal;
- De asemenea intalnita la fumatorii cronici;
- Seamana din punct de vedere structural cu fosfataza alcalina placentara.

Izoenzima Nagao

- Este o varianta a izoenzimei Regan;
- Detectata in metastazele pleurale si adenocarcinomul de pancreas sau duct biliar.

γ - Glutamyl transferase (γ GT)

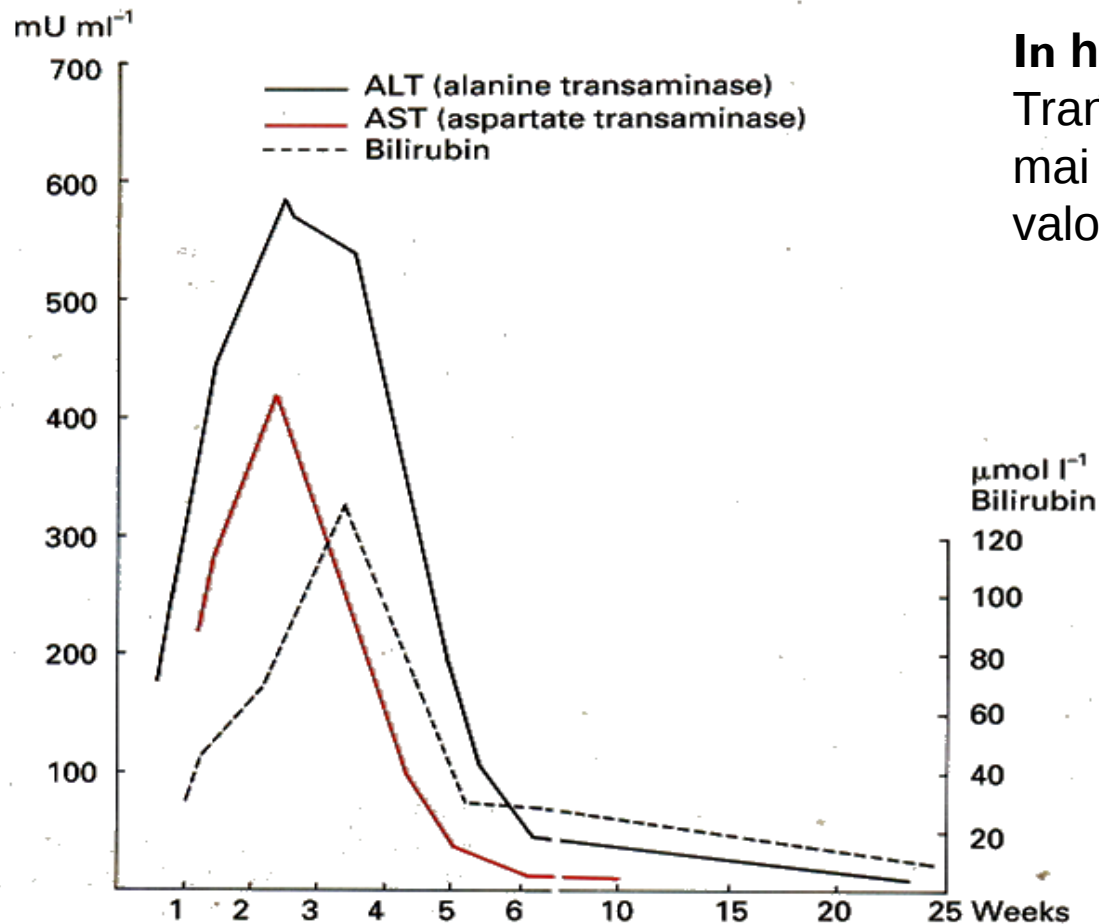


- Este implicat în transportul aminoacizilor prin membranele celulare;
- Se găsește la nivelul ductelor biliare hepatice, rinichi sau pancreas;
- Activitatea enzimatică este indusă de numeroase medicamente sau toxice, dar în particular de alcool;
- γ -GT crește în special în cazul icterului mecanic;
- Nivelurile γ -GT sunt utilizate ca și markeri ale afecțiunilor hepatice induse de alcool și ciroza hepatică.

5' Nucleotidaza

- Crește moderat în hepatite și foarte accentuat în obstrucția biliară;
- Spre deosebire de fosfataza alcalină, nivelul său plasmatic nu este legat de activitatea osteoblastică, deci nu este afectată de afecțiunile osoase;
- Enzima hidrolizează 5' nucleotidele la 5' nucleozide la un pH optim de 7,5.

Enzime relevante pentru afectiunile hepatice



In hepatitele virale
Transaminazele cresc
mai rapid decat
valorile bilirubinei.

3) Enzime serice in afectiunile osoase

- 1) **Fosfataza alcalina** – creste in rahitism, osteomalacie, hiperparatiroidism sau boala Paget. Creste de asemenea in neoplaziile primare sau secundare de la nivelul osului.
- 2) **Fosfataza acida** – creste marcat in metastazele osoase ale carcinomului de prostata.

4) Enzime serice in afectiunile musculare

1. **Aspartat Amino Transferaza** – nu este utilizata in mod comun;
2. **Aldolaza** – creste moderat in dermatomiozite, distrofiile musculare (valorile maxime se intalnesc in cazul Distrofiei Musculare Duchenne);
3. **CPK-** creste in distrofiile musculare neurogene, valorile maxime se intalnesc in cazul Distrofiei Musculare Duchenne.

5) Enzimele serice in afectiunile tractului gastro-intestinal

- **Amilaza**- O valoare a activitatii serice > 1000 unitati/l se intalneste in primele 24 h ale unei pancreatite acute, cu valoare diagnostica. O activitate serica crescuta se poate intalni, de asemenea, in ulcerul peptic perforat si ocluzia intestinala.
- **Lipaza**- Nivele serice peste 2800 U/l se intalnesc in pancreatita acuta. Pot fi intalnite, de asemenea, in ulcerul duodenal perforat si ocluzia intestinala.

6) Utilizarea enzimelor ca markeri tumorali

Enzyme	Disease
Serum acid phosphatase	Cancer prostate
Serum Alkaline phosphatase	Metastasis in liver, jaundice due to carcinoma head of pancreas, osteoblastic metastasis in bones
Serum LDH	Advanced malignancies and Leukemias
B- Glucuronidase	Cancer of urinary bladder
Leucine Amino Peptidase (LAP)	Liver cell carcinoma
Neuron specific Enolase	Malignancies of nervous tissue and brain

7) Utilizarea enzimelor ca reactivi pentru diagnostic

Enzyme	Used for testing
Urease	Urea
Uricase	Uric acid
Glucose oxidase	Glucose
Cholesterol oxidase	Cholesterol
Lipase	Triglycerides
Alkaline phosphatase	ELISA
Horse radish Peroxidase	ELISA
Restriction endonuclease	Recombinant DNA technology
Reverse transcriptase	Polymerase chain reaction

8) Utilizarea enzimelor ca agenti terapeutici

Enzyme	Therapeutic Application
Streptokinase/Urokinase	Acute MI, Pulmonary embolism, DVT(Deep vein thrombosis)
Trypsin, lipase and amylase	Pancreatic insufficiency
Asparaginase/Glutaminase	Acute lymphoblastic leukemias
Hyaluronidase	Enhanced local anesthesia and for easy diffusion of fluids
Papain	Anti inflammatory
Chymotrypsin	Pain killer and Anti inflammatory
Alpha- I Antitrypsin	Deficiency and Emphysema
Serratopeptidase	Pain killer and Anti inflammatory

Enzimele ca markeri diagnostici

NAME OF THE ENZYME	Conditions in which level of activity in serum is elevated
Aspartate Amino transferase (AST) Serum glutamate-oxaloacetate transaminase (SGOT)	Myocardial infarction, Liver disease especially with liver cell damage
Alanine Amino transferase (ALT) Serum glutamate-pyruvate transaminase (SGPT)	Liver disease especially with liver cell damage
Alkaline Phosphatase (ALP)	Liver disease- biliary obstruction Osteoblastic bone disease-rickets
Acid Phosphatase (ACP)	Prostatic carcinoma
γ glutamyl Transferase (γ GT)	Liver disorder like liver cirrhosis and alcoholism
Creatine kinase (CK)	Myocardial infarction and skeletal muscle disease(muscular dystrophy)
Lactate Dehydrogenase (LDH)	Myocardial infarction, other diseases like liver diseases, some blood diseases
α Amylase	Acute pancreatitis