

**FACULTATEA DE MEDICINĂ
NUTRIȚIE ȘI DIETETICĂ ANUL I
ȘEF LUCRĂRI DR. FELICIA SFRIJAN**
sfrijan.felicia@umft.ro

**BIOCHIMIE
Cursul nr. 4**

ENZIME. APLICAȚII ALE ENZIMELOR ÎN MEDICINĂ

I. ENZIME

În condiții de presiune de 1 atm., temperatură relativ joasă și pH bine definit, reacțiile chimice din organism nu se pot realiza la viteze foarte mari decât în prezența unor catalizatori foarte eficienți. Aceștia sunt produși chiar de organism, sunt de natură proteică și se numesc enzime (en zyme = în drojdie).

În ultimii ani s-au identificat și acizi ribonucleici cu funcție catalitică, substanțe numite ribozime.

Acțiunea enzimelor constă în accelerarea reacției, grăbind instalarea stării de echilibru. Față de catalizatorii obișnuiți, enzimele au următoarele particularități:

- domeniu moderat de temperatură, pH și presiune (37°C/7,4/1 atm);
- mare specificitate, absență produși secundari;
- efect net superior al acțiunii catalitice comparativ cu catalizatori artificiali, efect realizat prin scăderea energiei de activare a reactanților;
- în reacții reversibile, catalizează desfășurarea reacției în ambele sensuri, în funcție de concentrația reactanților și a produșilor de reacție.

1. Caracteristici ale enzimelor

1.1. Localizarea

Enzimele se găsesc în toate celulele organismului. Abundența lor crește cu nivelul activității biochimice, astfel, în celula pancreatică și hepatică, peste 70% din proteine exprimă activitate enzimatică. Localizarea la nivel celular este neuniformă, distribuția enzimelor depinzând de localizarea căilor metabolice în celulă.

Astfel, pentru fiecare organit celular există enzime caracteristice. De exemplu:

1. membrana plasmatică - 5'-nucleotidază, acetilcolinesterază
2. citosol - LDH (lactat dehidrogenaza)
3. peroxizomi - catalază
4. reticul endoplasmatic (RE) - glucozo-6-fosfataza
5. mitocondrie - succinat-dehidrogenaza

În unele cazuri, enzimele se agregă formând proteine multifuncționale ce execută succesiv mai multe acțiuni catalitice, un exemplu în acest sens fiind piruvat dehidrogenaza.

1.2. Specificitatea

Una din cele mai caracteristice proprietăți ale enzimelor este specificitatea lor, datorită căreia ele acționează preferențial numai asupra unui substrat sau a unui grup de substraturi. Specificitatea enzimelor este dublă: specificitate de substrat și specificitate de acțiune. Specificitatea de substrat îi este imprimată unei enzime de componenta sa proteică. La enzimele cu structură binară, componenta neproteică (coenzima) determină specificitatea de acțiune.

Specificitatea de acțiune sau reacție determină tipul de reacție chimică în care va fi angajat substratul. De exemplu, un aminoacid poate constitui substrat de reacție pentru mai multe enzime care catalizează reacții diferite, însă specifice, de transformare al aceluiași substrat, cu formarea de produși de reacție diferiți.

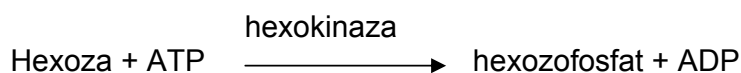
Aminoacid + oxidaza = hidroxiacid

Aminoacid + transaminaza = cetoacid

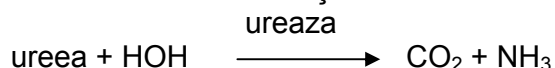
Aminoacid + decarboxilaza = amină

Specificitatea de substrat. Aceasta la rândul ei poate fi:

- *De grup* - enzima manifestă un spectru larg de activitate, acționând asupra unor substraturi asemănătoare chimic. De ex:
 - hexokinaza catalizează fosforilarea, în prezența ATP, a unei serii de hexoze ca substraturi.



- esteraze (hidrolizează esterii aceluiași alcool cu acizi diferiți).
- fosfataze catalizează hidroliza esterilor fosforici (esteri ai acidului fosforic cu diverși alcooli).
- *Absolută* – este acea specificitate în care enzima acționează strict numai asupra unui anumit substrat. De ex: ureaza acționează numai asupra ureei:



- *Stereospecificitatea* - enzima acționează numai asupra unuia din izomerii unui substrat. De ex: α -amilaza hidrolizează doar legăturile α (1 \rightarrow 4) din amidon și/sau glicogen.

1.3. Structura enzimelor

Este subordonată acțiunii catalitice pe care trebuie să o realizeze. Această acțiune poate fi realizată cu sau fără ajutorul unor componente neproteice numite cofactori enzimatici.

Astfel, enzimele se pot clasifica în două mari grupe:

1. **Enzime simple** – constituite în întregime din resturi de aminoacizi. Sunt alcătuite numai din componenta proteică. Aceste enzime catalizează în special reacții de liză. Numărul enzimelor care prin hidroliză eliberează numai aminoacizi, deci sunt proteine pure, este relativ redus. De ex. ribonucleaza (care catalizează hidroliza acizilor ribonucleici), chimotripsina și lizozimul.
2. **Enzime complexe** – constituite din 2 componente:
 - a. **Componenta proteică**, numită **apoenzimă** este responsabilă de specificitatea de substrat a enzimei. Apoenzima manifestă proprietățile generale ale proteinelor, este termolabilă și nedializabilă. În structura ei este localizat situsul

catalitic și cel alosteric. Determină legarea substratului la situsul catalitic sau a efectorului alosteric la situsul alosteric. Formează complexe enzima-substrat și enzima-cofactor. Manifestă grade diferite de afinitate pentru cofactor. Acesta poate fi legat labil sau foarte strans de apoenzimă prin legături covalente, fiind susceptibilă de modificări conformaționale.

- b. **Componenta neproteică**, numită **cofactor enzimatic**, responsabilă de specificitatea de acțiune a enzimei este indispensabilă pentru manifestarea activității catalitice a enzimei. În funcție de natura chimică și modul de legare, cofactorii enzimatici se împart în:

- **COENZIME** – sunt substanțe neproteice de natură organică cu masa moleculară mică. Se leagă prin legături foarte slabe de apoenzime, iar separarea lor de enzimă nu denaturează structura enzimei, dar îi afectează activitatea. Sunt în principal derivați ai vitaminelor hidrosolubile:

Vitamina hidrosolubilă	Coenzima
Vitamina B ₁ (tiamina)	Tiaminpirofosfatul (TPP)
Vitamina B ₂ (riboflavina)	Flavin mononucleotid (FMN) Flavin adenin dinucleotid (FAD)
Vitamina PP (nicotinamida)	Nicotinamidadenindinucleotidul (NAD ⁺) Nicotinamidadenindinucleotid-fosfatul (NADP ⁺)
Vitamina B ₆ (piridoxal)	Piridoxalfosfatul
Acidul pantotenic	Coenzima A
Biotina	Biotina
Acidul folic	Acidul tetrahidrofolic (FH ₄) și derivații săi
Vitamina B ₁₂ (cobalamina)	Coenzima B ₁₂

Sunt atașate labil de enzimă, putând fi detașate de aceasta și atașate altor enzime. Coenzimele au, în general, o afinitate pentru enzime asemănătoare substratului reacției, fiind numite, din acest motiv, cosubstrate (al doilea substrat). În cadrul reacției, ele preiau și transferă componente ale substratului sau componente proprii.

1. Glucoză + hexokinază – ATP → glucoză-6-P + hexokinază – ADP
2. Acid piruvic + lactatdehidrogenază – NADH(H⁺) → acid lactic + lactatdehidrogenază – NAD⁺
3. Acid succinic + succinatdehidrogenază – FAD → acid fumaric + succinatdehidrogenază – FADH₂

- **GRUP PROSTETIC** – ce cuprinde derivați ai vitaminelor B₁ – tiamin-pirofosfat, B₆ – piridoxal-fosfat, biotină, dar și componente diferite ca hemul și ionii metalici. Acestea sunt legate covalent la nivelul centrului catalitic și nu pot fi detașate de enzimă decât prin denaturarea enzimei.

Ionii metalici sunt cofactori la 2/3 din enzime și intervin în funcția catalitică.

- Participă la legarea substratelor și a cofactorilor enzimatici: Mg²⁺ - ATP
- Stabilizează conformația activă a enzimei
- Acționează ca acizi Lewis sau în cataliza electrofilă

Legarea Zn^{2+} crește densitatea electronică a oxigenului din molecula apei, activând-o astfel pentru atacul nucleofil la carbonul din CO_2 .



- Substrat donor de electroni în reacții de oxido-reducere (Fe, Zn, Cu, Mn, exemplu: $Cu^{2+} \rightleftharpoons Cu^+$).
Cu și Fe pot avea rol specific în activarea oxigenului în structura unor oxidaze și hidrolaze

Ionii metalici

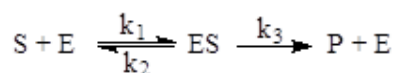
- Pot fi legați strâns de enzimă (așa-numitele metalo-enzime)
- Pot participa la reacție legați labil (chelați) de enzimă sau de substratul acesteia

Legarea ionului metalic este în funcție de apoenzimă, astfel enzimele ce catalizează același tip de reacție pot avea, în funcție de țesutul în care își desfășoară acțiunea, cofactori metalici diferiți.

1.4. Acțiunea enzimelor

a. Legarea substratului

Enzimele acționează prin formarea unui complex cu molecula substratului (ES), micșorând energia de activare necesară convertirii substratului în produs. Pentru o reacție simplă, cu un singur substrat, se poate scrie reacția:



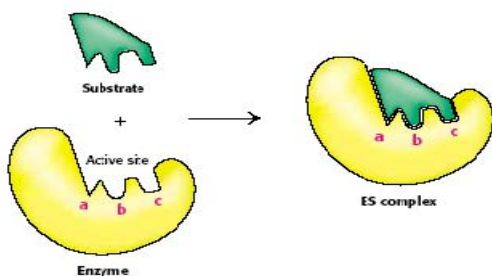
Majoritatea enzimelor sunt proteine ce posedă la suprafață situsuri specifice de legare a substratului. Conformația enzimei creează regiuni complementare (mărime, topologie, sarcină electrică) cu substratul asupra căruia acționează.

Toleranța acestor situsuri poate fi atât de mică, încât doar un izomer dintr-o pereche de diastereoizomeri va fi legat. De exemplu, doar D-aminoacizii vor fi oxidați de D-aminoacidoxidază.

b. Mecanismul acțiunii catalitice

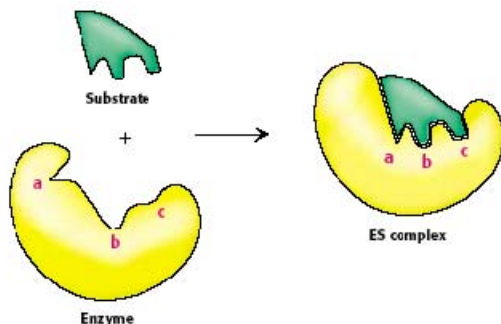
Pentru a explica legarea substratului de enzimă au fost propuse mai multe modele.

Primul a fost propus de Fischer (1895) – **modelul cheii și lacătului**, care considera că între enzimă și substrat există o complementaritate sterică de cheie - lacăt. Acest model rigid nu poate explica actul catalitic și nici efectele alosterice.



Modelul "lacăt-cheie" al interacțiunii enzimă-substrat

Modelul adaptării (potrivirii) induse (Koshland, 1968) este modelul acceptat la ora actuală. Acesta consideră existența în structura enzimei a unor regiuni specifice care sunt situsuri de legare ale substratului și situsuri active, catalitice, ce transformă substratul în produs de reacție. Aceste situsuri nu au o orientare preformată, ci interacțiunea enzimei cu substratul induce o modificare a conformației enzimei în urma căreia are loc o „armonizare” cu structura substratului. Această armonizare implică și situsurile de legătură și cele active, ce constituie centrul catalitic. Modificările conformaționale produc acțiuni catalitice (acido-bazice, electrostatice, covalente) asupra legăturilor substratului în urma cărora se rup legături din molecula substrat, formându-se legături și molecule noi. De exemplu, enzima hexokinază are o conformație ca două aripi, care în prezența substratului (glucoza) se strâng ca două fălci în jurul acestuia



Modelul adaptării induse

Aminoacizii ce fac parte din situsurile enzimei sunt adaptați tipurilor de acțiune exercitată, astfel:

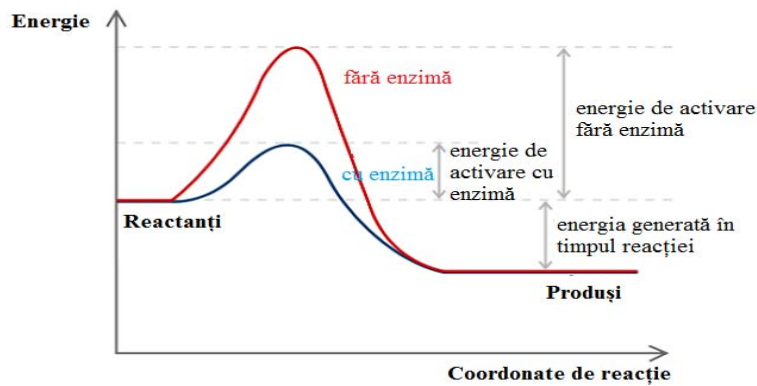
- În situsurile de legare predomină aminoacizi nepolari (Ala, Val, Leu, Phe), ce vor forma legături hidrofobe cu substratul.
- În situsurile active, catalitice, predomină aminoacizi polari sau ionizabili (Ser, Cis, Glu, Asp, Lis, His). În general, numărul acestora este foarte mic, 2-5 resturi de aminoacizi. De exemplu, în cazul ribonucleazei, din 124 resturi de aminoacizi, doar 2, His 12 și His 129, fac parte din centrul catalitic activ.

Ambele tipuri de situsuri constituie **centrul catalitic activ** ce poate fi definit ca zona delimitată din enzimă ce realizează legarea și transformarea substratului. El conține situsuri de legare ce orientează stereospecific substratul în scopul obținerii unei poziții optime pentru realizarea actului catalitic și situsuri active catalitice ce desfac legăturile din molecula substratului și formează altele noi.

c. Mecanisme de acțiune enzimatică

Pentru ca o reacție chimică să aibă loc, este necesar ca reactanții să aibă suficientă energie pentru a depăși bariera energiei de activare. Reactanții aflați în această postură constituie un complex numit stare de tranziție (Ts). Acest complex poate evolua spre formarea de produși, sau înapoi în stare de reactant.

În reacția catalizată enzimatic, enzima permite fragmentarea energiei de activare. S-a constatat că enzima are o afinitate mult mai mare pentru complexul de tranziție Ts. Astfel, fracția din molecula substrat ce există sub formă Ts va fi rapid transformată în produși și apoi, ca urmare a legii echilibrului chimice, întreaga cantitate de substrat va fi rapid convertită în produși.



Principiul general al catalizei enzimatice.

2. Izoenzime

Sunt forme moleculare multiple, cu structuri diferite, care catalizează aceeași reacție enzimatică.

2.1. Diferențierea izoenzimelor

Este dată de diferențele genetice între moleculele proteice. Se pot distinge trei categorii:

- *Izoenzime ale căror gene sunt total diferite.* Exemplu: malatdehidrogenaza din citoplasmă și din mitocondrie sunt enzime cu structură primară total diferită.
- *Izoenzime ale căror gene sunt duplicate, de tip heteropolimer* formate prin asocieri diferite a două sau mai multe catene polipeptidice. Exemplu. LDH ($M=132000$) este formată din patru catene de 2 tipuri α , β , existând 5 izoenzime: $LDH_1\alpha_4$, $LDH_2\alpha_3\beta$, $LDH_3\alpha_2\beta_2$, $LDH_4\alpha\beta_3$, $LDH_5\beta_4$.
- *Aleloenzime sintetizate de alele ale aceleiași gene*, ce cuprind proteine ce diferă printr-o unitate punctuală (înlocuirea unui aminoacid cu un altul).

Izoenzimele prezintă proprietăți fizico-chimice diferite pe baza cărora pot fi separate între ele:

1. Termostabilitate;
2. pH optim;
3. Constantă Michaelis-Menten;
4. Migrare electroforetică.

2.2. Izoenzime cu aplicații în clinică

1. **Creatinkinaza (CPK)** este o enzimă dimerică formată din două tipuri de subunități M (tip muscular) și B (tip creier). Se disting astfel 3 izoenzime cu structura:

- a. MM (mușchi scheletici) CPK_3
- b. MB (numai în miocard) CPK_2
- c. BB (în creier) CPK_1

Izoenzimele se separă prin electroforeză și sunt numerotate în ordinea migrării la anod.

2. **Lactatdehidrogenaza** – este o enzimă tetramerică formată din două tipuri de subunități H (miocard) și M (mușchi). Cele 2 subunități se pot combina în 5 variante:

a. LDH1	HHHH	miocard și hematii
b. LDH2	HHHM	leucocite
c. LDH3	HHMM	plămân
d. LDH4	HMMM	rinichi, placentă, pancreas
e. LDH5	MMMM	ficat și mușchi

După un infarct miocardic, CPK₂ serică crește la 6-18 ore după infarct și, de asemenea, LDH₁ și LDH₂, având loc o inversare a raportului de la LDH₂ > LDH₁ la LDH₁ > LDH₂. Aceste efecte reprezintă diagnosticul infarctului miocardic în 100% din cazuri.

Creșterea activității LDH₅ este asociată cu o congestie a ficatului.

3. Cinetica reacțiilor enzimatic

3.1. Terminologie

Viteza unei reacții catalizate enzimatic se măsoară în μmoli de substrat transformați în produs/minut la 25°C și 1 atm și pH optim al enzimei.

Activitatea enzimatică reprezintă numărul de μmoli de substrat transformați în produs/minut la 25°C și 1 atm și pH optim al enzimei de către unitatea de volum de preparat enzimatic (litru) sau cantitatea de enzimă

1 unitate standard (internațională) = 1 μmol substrat/minut de activitate enzimatică, este cantitatea de enzimă ce transformă 1 μmol substrat/minut.

Activitatea specifică a unui preparat enzimatic este în funcție de numărul de unități enzimatic/mg de proteină: $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{mg}$ proteină.

Constanta catalitică (katal) este egală cu numărul de unități de activitate/mol de enzimă.

Conform noilor recomandări ale Comisiei de Nomenclatură enzimatică a IUBMBiol se recomandă o nouă măsură pentru activitatea enzimatică: katalul.

1 katal = 1 mol substrat/1 secundă.

Există submultipli: mkat (10^{-3} kat), μkat (10^{-6} kat), nkat (10^{-9} kat), pkat (10^{-12} kat)

Viteza maximă (V_{max}) este viteza reacției enzimatic obținută în condiții de saturare a enzimei cu substrat și în condiții optime de pH, temperatură, tărie ionică. V_{max} este o constantă specifică fiecărei enzime.

3.2. Factori implicați în cinetica enzimatică

Viteza unei reacții catalizate enzimatic depinde de factori ca: temperatură, pH, concentrație de enzimă, activatori și inhibitori.

3.2.1. Temperatura

Ca și în cazul reacțiilor necatalizate, creșterea temperaturii crește viteza reacțiilor catalizate enzimatic. Q_{10} , coeficientul de temperatură reprezintă factorul de creștere al vitezei de reacție la creșterea temperaturii cu 10°C, având în general, valoarea 2.

Creșterea vitezei este limitată de temperatura la care începe ruperea legăturilor slabe, hidrofobe și de hidrogen, ce mențin conformația enzimei și care produce denaturarea enzimei și pierderea proprietăților catalitice.

Deși fiecare enzimă prezintă o activitate catalitică mare la o anumită temperatură, aceasta nu este un parametru de referință, fiind la limita de stabilitate a enzimei. Aceasta

nu va putea funcționa mult timp la temperatura respectivă fără pierderea progresivă a activității catalitice.

Majoritatea enzimelor din organism au o activitate optimă în jurul temperaturii de 37°C, creșterea temperaturii peste această valoare ducând la pierderea activității enzimatice.

3.2.2. pH

Pentru o enzimă cu structură proteică, pH-ul soluției este responsabil pentru modificări structurale și ale stării de ionizare a resturilor de aminoacizi ce intră în constituția centrului catalitic activ. Ca atare, modificările de pH vor afecta activitatea catalitică a enzimei. Din acest motiv, pH-ul fiziologic = $7,4 \pm 0,05$ este unul din parametrii de stare ai homeostaziei.

Fiecare enzimă prezintă o activitate maximă la o anumită valoare de pH, numit pH optim de acțiune. Cu mici excepții (pepsina), enzimele au valoarea pH-ului optim cuprinsă între 5-9.

3.2.3. Activatori enzimatici

Sunt factori sub acțiunea cărora crește viteza reacției catalizate enzimatic. Deosebim o activare directă și indirectă.

1. Activare directă. Are loc prin acțiunea nemijlocită asupra structurii enzimei sau a legăturii enzimă-substrat. Astfel, în cazul enzimelor proteolitice din suc pancreatic, acestea sunt sintetizate sub o formă matură, numită *zimogen*. În zimogen, centrul catalitic activ este mascat de un fragment de catenă N-terminal. În intestin, acest fragment este hidrolizat autocatalitic sau sub acțiunea tripsinei, proces prin care centrul activ este demascat și enzima devine activă.

În cazul enzimelor ce leagă substratul prin intermediul unor ioni metalici (Enz-Mg²⁺-ATP), adăugarea metalului respectiv va crește viteza de reacție. Exemplu: Cl⁻ stimulează activitatea amilazei salivare.

2. Activare indirectă. Este numită și antiinhibiție, deoarece factorul activator nu acționează asupra enzimei, ci blochează activitatea inhibitorilor enzimei.

Astfel, substanțele cu caracter reducător (vitamina C, cisteina, glutatiónul) protejează grupările SH de centrul activ al diferitelor enzime, împiedicând inhibiția acestora prin acțiunea agenților oxidanți. Un alt exemplu îl constituie acțiunea CN⁻ ce blochează Cu²⁺, un inhibitor puternic al activității ureazei. Acțiunea CN⁻ va duce astfel la creșterea activității enzimei.

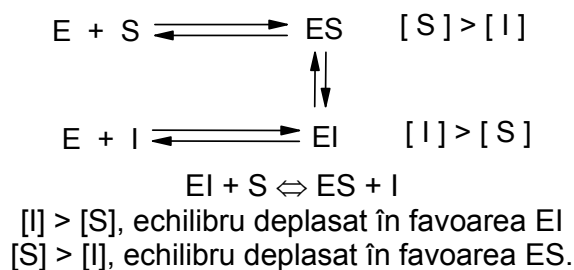
3.2.4. Inhibitori enzimatici

Sunt factori ce reduc sau anulează activitatea catalitică a enzimei. Inhibitorii pot fi clasificați în:

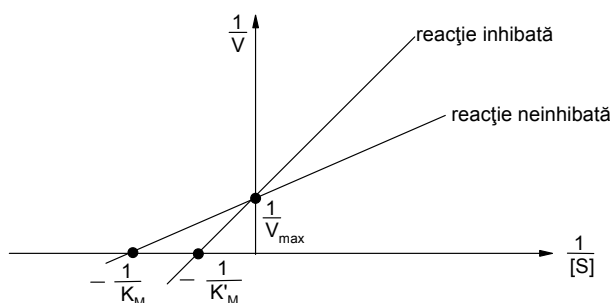
- Competitivi;
- Non-competitivi;
- Incompetitivi;
- Ireversibili;
- Antienzime.

a. Inhibitori competitivi. Sunt substanțe ce se leagă reversibil la nivelul situsului activ, catalitic, al enzimei, blocând accesul substratului (concurență cu substratul). În general, inhibitorii competitivi au o structură asemănătoare cu substratul, păcălind enzima.

În cazul în care o enzimă acționează asupra mai multor substanțe, acestea acționează unul față de altul ca inhibitori competitivi. Cei mai eficienți inhibitori sunt analogii stării de tranziție a reacției, știindu-se că enzima are o eficacitate mărită pentru intermediari de reacție.

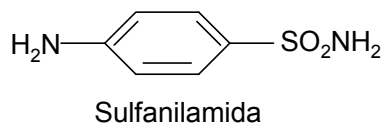
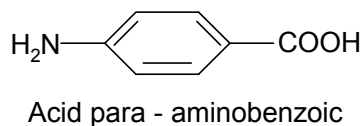


Deoarece este necesar un exces de S pentru a deplasa echilibrul spre dreapta, valoarea K_M a reacției va crește.

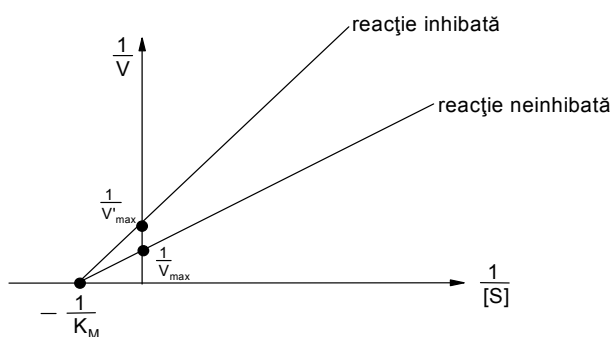


Exemplu: acțiunea acidului malonic asupra succinat dehidrogenazei.

Aplicații terapeutice: efectul bacteriostatic al sulfamidelor se bazează pe competiția PABA și medicamentul sulfamidă în sinteza catalizată enzimatic de acid folic.

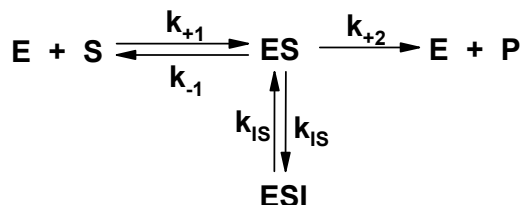


b. Inhibitori necompetitivi. Sunt substanțe ce se leagă reversibil de enzimă, dar în altă parte decât centrul activ, deci inhibitorul nu este concurent cu substratul. Legarea inhibitorului induce efecte alosterice, modificând conformația enzimei și, implicit, reduce activitatea catalitică. În acest tip de inhibiție, K_M rămâne nemodificat, dar modificarea structurii enzimei o împiedică să aibă activitate maximă, deci viteza maximă scade.

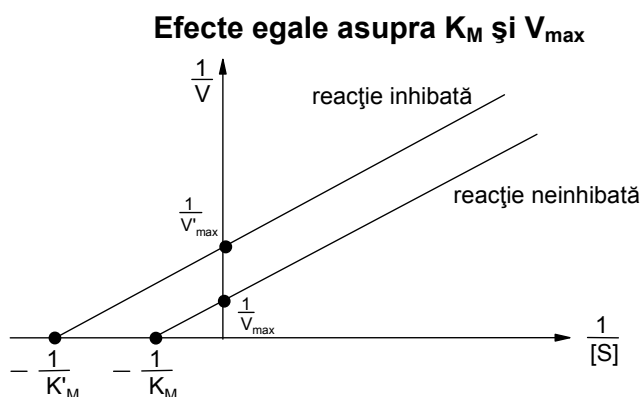
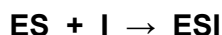


Exemple: temperatura – are ca efect denaturarea enzimelor; metalele grele – blochează grupările SH din conformația enzimei inhibând activitatea enzimatică.

c. Inhibitori incompetivi



Inhibitorii se leagă de complexul [ES]. În acest caz, raportul K_M/V_{\max} va rămâne neschimbat, obținându-se în reprezentarea grafică o dreaptă paralelă cu cea a reacției neinhibate. În acest caz K_M crește.



d. Inhibitori ireversibili. Sunt substanțe ce se fixează de enzimă prin legături covalente ireversibile. Efectul lor duce la blocarea activității enzimei. Inhibitorii se pot lega fie la nivelul centrului activ, fie în alt loc.

Exemple: compușii cu mercur sau iodoacetații reacționează cu grupările -SH ale resturilor de cisteină libere din centrul catalitic activ; dietilpirocarbonatul reacționează cu histidina din centrul activ. Un caz particular este cel al metaloenzimelor, la care blocarea ionului metalic duce la inhibiția enzimei: de exemplu blocarea Ca^{2+} și Mg^{2+} cu agentul chelator EDTA.

e. Inhibiția prin antienzime. Antienzimele sunt substanțe de natură proteică ce inhibă specific anumite enzime. De exemplu, în sânge există permanent inhibitori ca $\alpha 1$ -antitripsina sau $\alpha 1$ -antitrombina, ce neutralizează enzimele respective. Paraziții intestinali, de exemplu *Ascaris Lumbricoides*, secretă inhibitori ai tripsinei și chimotripsinei, fapt ce le permite existența în intestin.

4. Reglarea activității enzimatică

Condițiile schimbătoare ale mediului impun un răspuns permanent de adaptare al organismului, răspuns materializat prin modificarea metabolismului. Deoarece căile metabolice sunt succesiuni de reacții catalizate enzimatic, reglarea activității enzimatică constituie principalul element în modificările metabolice.

Reglarea acțiunii enzimelor se realizează prin 2 mecanisme principale:

- Modificarea cantității de enzimă;
- Modificarea activității enzimelor prin modificări alosterice (inhibitori, activatori) sau modificare covalentă.

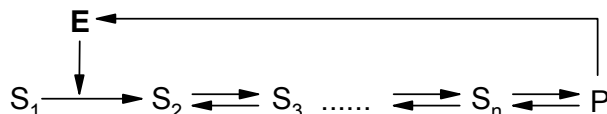
4.1. Reglarea cantității de enzimă. Este un mecanism primitiv, lent, consumator de energie și materie. Mecanismul presupune reglarea procesului de sinteză a enzimelor (transcripție, traslație), respectiv de catabolizare a lor și poate fi:

- *Inducție a sintezei enzimatice:* ca inductor la bacterii funcționează substratul, iar la mamifere semnalele hormonale.
- *Represie a sintezei enzimatice:* ca represor la bacterii funcționează produsul reacției, iar la mamifere semnalele hormonale.
- *Catabolismul enzimelor.*

4.2. Reglarea activității enzimatice. Se realizează prin modularea activității, alosteric sau covalent a unei cantități fixe de enzimă.

Reglarea alosterică. Activitatea reglatoare este realizată de substanțe numite *efectori*. Aceștia au în general o masă mică, nu seamănă cu substratul sau produsul de reacție și se atașează de enzimă în altă zonă decât centrul catalitic activ. Atașarea efectorului de enzimă induce modificări ale conformației acesteia, ce cuprind și centrul catalitic activ, modificând astfel afinitatea enzimei pentru substrat. În funcție de efectul asupra activității catalitice, efectorii sunt pozitivi sau negativi. Enzimele reglate în acest fel se numesc *enzime alosterice*.

Un exemplu îl constituie reglarea alosterică prin produsul unei căi metabolice, care își inhibă propria sinteză, inhibând enzima ce catalizează etapa limitantă a căii metabolice.



Creșterea concentrației lui P peste o anumită limită inhibă enzima E (produsul=efector negativ), iar la scăderea concentrației P activitatea enzimei revine la normal. Procesul se numește *feed-back negativ* sau *retroreglare negativă*.

Din punct de vedere cinetic, există 2 clase de enzime reglate alosteric:

- Enzime din clasa K, la care efectorul alosteric afectează resturile de aminoacizi din situsurile de legătură, în urma căruia se modifică K_M , V_{max} rămânând la aceeași valoare.
- Enzime din clasa V la care modificările din situsurile catalitice afectează valoarea lui V_{max} , în timp ce K_M rămâne nemodificat.

Efectul alosteric la enzima oligomeră ce are un singur tip de monomer este de două tipuri:

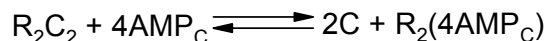
- a) *Homotropic* – legarea efectorului la o unitate protomerică influențează legarea aceluiași ligand la ceilalți monomeri.
- b) *Heterotropic* – când legarea unui efector influențează legarea altui efector.

Influența legării efectorului la un protomer asupra celorlalți protomeri = cooperativitate și ea produce o curbă sigmoidă a dependenței vitezei de concentrația substratului.

Pentru enzime oligomere cu două tipuri de monomeri, s-a constatat că aceștia sunt:

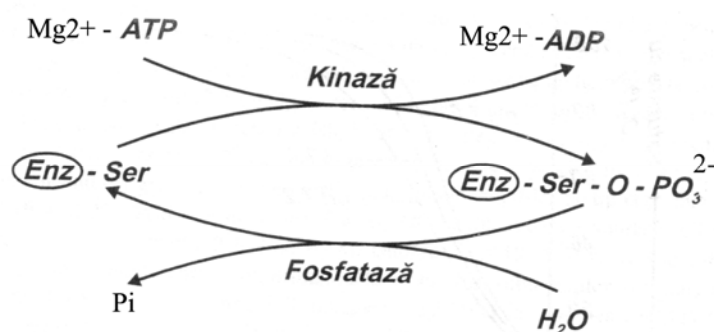
- a) Subunități reglatoare ce au situsuri alosterice pentru efectori +, efectori - și legare subunități catalitice.
- b) Subunități catalitice.

De exemplu, proteinkinaza A este un tetramer format din două tipuri de protomeri 2R și 2C. Legarea efectorului pozitiv, AMPc, la subunitățile reglatoare (R) eliberează subunitățile catalitice (C) din tetramerul inactiv, enzima devenind activă.



Reglarea covalentă. Se realizează prin atașarea sau detașarea covalentă a unei grupări din molecula enzimei. Cea mai frecventă modalitate este reglarea prin fosforilare-defosforilare, în care gruparea atașată-detașată este o grupare fosfat ce formează legături esterice cu gruparea OH de la resturile de Ser, Tre, Tyr din constituția enzimei. Donatorul de fosfat este ATP, iar enzimele ce realizează procesul sunt:

- *Kinaze* pentru atașarea grupării fosfat;
- *Fosfataze* pentru hidroliza grupării fosfat.



Enzimele reglate prin fosforilare-defosforilare pot fi active sub formă defosforilată (glicogen-sintetaza, piruvat-dehidrogenaza) sau fosforilată (fosforilaza, triglicerid-lipaza).

Alte modificări covalente reversibile pot consta în atașarea-detașarea unui rest de AMP (adenilare) sau ADP (ADP-ribozilare).

Există și modificări covalente, ireversibile, atunci când molecula enzimei suferă o hidroliză parțială în urma căreia rezultă o modificare a proprietăților enzimei respective în procese ca:

- Activarea proteazelor din precursori inactivi (zimogene);
- Activarea proteazelor implicate în coagularea sângelui;
- Activarea proteazelor implicate în apoptoză (moartea celulară programată).

5. Nomenclatura și clasificarea enzimelor

Unele enzime au fost denumite în raport cu funcția lor, de ex: lactat dehidrogenaza.

Altele au primit denumirea după substratul asupra căruia acționează enzima, urmat de sufixul „ază”. De exemplu: amilază (catalizează hidroliza amidonului), lipază (catalizează hidroliza lipidelor), urează (catalizează hidroliza ureei). Acestea au constituit baza nomenclurii funcționale.

Unele enzime importante în diagnosticul clinic au primit nume particulare, fără legătură cu reacția catalizată: tripsina, pepsina, chimotripsina.

În 1961, Uniunea Internațională de Biochimie a introdus nomenclatura și clasificarea enzimelor. Astfel, numele enzimei este format din numele substratului + numele cofactorului + numele tipului reacției + sufixul -ază. De exemplu: L-lactat- NAD^+ -oxidoreductază.

În sistemul de clasificare internațională fiecare enzimă este încadrată într-o clasă și, în cadrul acesteia, într-o subclasă. În anumite cazuri există și sub-subclase.

Clasele, subclasele, sub-subclasele și enzimele individuale se notează în ordinea menționată, prin cifre despărțite de puncte. Fiecare enzimă este codificată printr-un număr de cod format din 4 cifre și un prefix: EC (enzyme classification) - $X_1X_2X_3X_4$, în care:

- X_1 reprezintă clasa căreia îi aparține enzima. Există 6 clase:
 1. **Oxidoreductaze** (transfer de electroni, de atomi de hidrogen sau fixare de oxigen).
 2. **Transferaze** (transfer de atomi sau grupe de atomi, altele decât cele din clasa 1).
 3. **Hidrolaze** (scindare de legături chimice cu ajutorul apei).
 4. **Liaze** (scindare de legături în alt mod decât hidroliză).
 5. **Izomeraze** (reacție ce conservă formula brută a compusului).
 6. **Ligaze** (formarea de legături între carbon și un nemetal, utilizând energia eliberată de ATP).
- X_2 reprezintă subclasa enzimei, în funcție de mecanismul de acțiune.
- X_3 reprezintă sub-subclasa enzimei în funcție de cofactorul enzimatic.
- X_4 reprezintă număr de ordin al enzimelor individuale în sistemul de clasificare.

De exemplu, L-lactat- NAD^+ -dehidrogenaza prezintă numărul de cod $\text{EC} = 1.1.1.27$, ceea ce arată că această enzimă este o oxidoreductază (EC 1) și este a 27-a enzimă clasificată în subclasa 1.1.

Această clasificare precizează și completează nomenclatura funcțională. Dacă într-o publicație se utilizează numele funcțional, acesta va trebui urmat întotdeauna de numărul din nomenclatura oficială.

Nomenclatura funcțională este încă utilizată și desemnează o enzimă prin nume substrat + tip reacție + -ază. De exemplu, piruvat-carboxilază, glucozo-6-fosfat-izomerază.

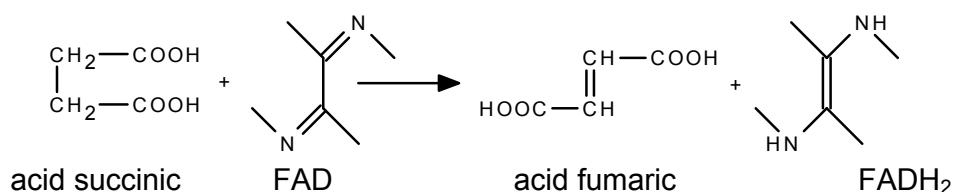
În cazul în care enzima utilizează 2 substraturi se indică:

- Substratul donor;
- Substratul acceptor;
- Gruparea transferată;
- Tipul reacției;
- Sufixul -ază.

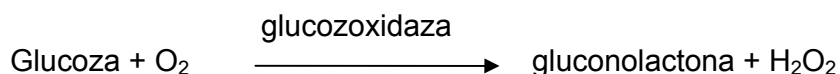
De exemplu, glutamat piruvat aminotransferază, ATP-glucoză-fosfotransferază.

I. Oxidoreductazele – sunt în principal enzime ce *catalizează reacția de transfer de electroni sau de hidrogen în cadrul unor reacții de oxido-reducere*, fiind numite dehidrogenaze sau reductaze. O mică parte o constituie oxigenazele, care fixează oxigenul pe substrat pentru a crea funcții oxigenate. Există 5 subclase în funcție de substratul oxidat ($-\text{CH}_2-\text{OH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2$) și de cofactorii enzimatici (NADP^+ , FAD sau derivați porfirinici) utilizați în transferul echivalenților reducători.

a. Dehidrogenazele sunt enzime care catalizează transferul de electroni sau protoni de la un substrat la altul. Se clasifică în funcție de coenzimele implicate (FAD , NAD^+ , NADP^+). Exemplu: Succinat- FAD -dehidrogenaza catalizează dehidrogenarea acidului succinic la acid fumaric:

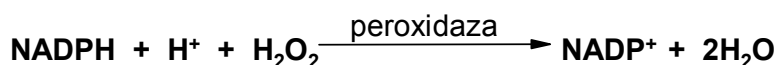


b. Oxidazele sunt enzime care catalizează transferul de electroni de la un donator la oxigen rezultând apa oxigenată. De ex. glucozoxidaza (EC1.1.3.4.) catalizează reacția de oxidare a glucozei la gluconolactona.



c. Oxigenazele sunt enzime care catalizează incorporarea oxigenului în substrat. Dioxigenazele catalizează incorporarea O_2 într-un singur substrat, iar monooxigenazele catalizează incorporarea unui atom de oxigen, sub forma de hidroxil într-un substrat.

d. Peroxidazele sunt enzime care catalizează descompunerea apei oxigenate conform reacției:



e. Catalaza catalizează descompunerea apei oxigenate conform reacției:



II. Transferazele – cuprind enzimele ce catalizează transferul unor grupări funcționale de la un donator la un acceptor. Există mai multe subclase, în funcție de tipul grupării transferate:

- a. Metilaze – transferă radicali metil la diferite subclase acceptor, ca: homocisteină, colamină, noradrenalină, uracil. Radicalul metil se găsește sub forma S-adenozil-metionină.



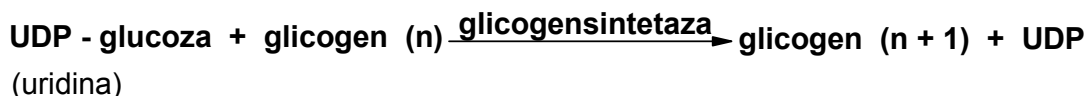
- b. Aminotransferaze (transaminaze) – transferă o grupare amino de la un aminoacid donator la un α -cetoacid acceptor rezultând un nou aminoacid și un nou cetoacid:



- c. Acil-transferaze – transferă radicalii acil ($\text{R} - \text{CO}$)



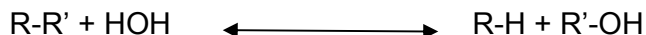
- d. Transfer de molecule glucidice transferă un rest glucozil pe un glicogen primer:



- e. Fosfotransferaze (kinaze) – transferă un rest fosfat $-\text{PO}_3\text{H}_2$ de la o moleculă donator adenozintrifosfați (ATP, UTP, CTP) la o moleculă acceptor (glucide, lipide, creatină, acizi), pe grupări acceptoare alcool sau amino.



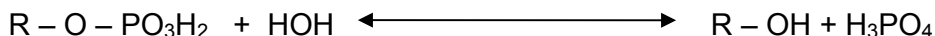
III. Hidrolaze – sunt enzime ce catalizează scindarea hidrolitică a moleculelor de substrat prin clivarea legăturilor dintre un atom de carbon și alți atomi sub acțiunea apei, conform reacției generale:



Nu au coenzime. În funcție de natura substratului asupra căruia acționează, există mai multe subclase:

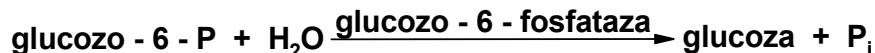
- a. Hidrolaze de glucide (glicozidaze) – catalizează hidroliza legăturilor glicozidice din oligo și polizaharide. Exemple:
 - α -amilaza acționează asupra legăturilor glicozidice interne, situate în pozițiile 1-4 din interiorul catenelor de amidon, cele mai cunoscute sunt amilaza salivară (ptialina) și amilaza pancreatică;
 - β -amilaza catalizează scindarea legăturilor 1-4 glicozidice terminale din molecula amidonului;
 - α -(1,6)glicozidaza catalizează hidroliza legăturilor 1-6 din amilopectină;
 - hialuronidaza catalizează depolimerizarea acidului hialuronic;
 - α -galactozidaza catalizează hidroliza lactozei;
 - invertaza catalizează scindarea zaharozei în glucoză și fructoză.
- b. Hidrolaze de esteri fosforici – enzime care catalizează hidroliza esterilor acidului fosforic cu formare de alcool și H_3PO_4

Fosfomonoesteraza



Monoesterii acidului fosforic sunt hidrolizați de către fosfomonoesteraze, iar diesterii acidului fosforic de către fosfodiesteraze.

- fosfomonoesterazele (fosfatazele) sunt de mai multe tipuri, în funcție de pH-ul optim de acțiune:
 - fosfataza acidă acționează la pH = 5,0–5,6;
 - fosfataza alcalină acționează la pH = 8,6–9,4;
 - glucozo-6-fosfataza



- fosfodiesterazele catalizează hidroliza legăturilor fosfodiester, de ex: dezoxiribonucleaza și ribonucleaza.
 - c. Hidrolaze de lipide (lipaze) – hidrolizează triacilglicerolii eliberând succesiv acizii grași care esterifică funcțiile alcoolice ale glicerolului.
 - d. Hidrolaze de peptide și proteine (peptidaze) – hidrolizează legături peptidice din proteine. Exemple: peptidazele din sucurile digestive, din plasmă, din țesutul conjunctiv, cathepsine, etc.
 - e. Hidrolaze de nucleotide, nucleozide și acizi nucleici (nucleaze, nucleotidaze, nucleozidaze) – hidrolizează legături N-glicozidice, fosfodiesterice, în urma cărora:
 - Acizii nucleici → nucleotide

- Nucleotide → nucleozide + ATP
- Nucleozide → riboză + bază azotată

IV. Liaze (sintaze) – sunt enzime ce catalizează scindarea nehidrolitică a unor legături chimice din molecula substratului. În aceasta clasă intră liazele carbon - carbon, carbon - oxigen, carbon - azot.

- Decarboxilaze - elimină dioxid de carbon.
- Aldolaze – scindează legătura C3 – C4 din hexoze, de ex. fructozo 1,6 – bifosfat aldolaza
- Hidrataze și dehidrataze – fixează sau elimină o moleculă de apă. Sunt liaze carbon – oxigen. De ex. fumaraza catalizează conversia acidului fumaric în acid malic.

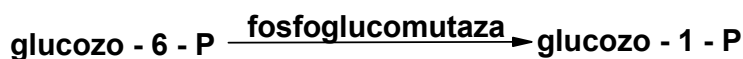


Alt exemplu este anhidraza carbonică care catalizează reacția de mai jos:

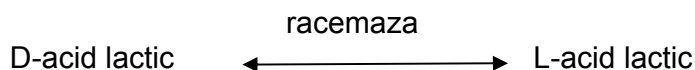


V. Izomeraze – catalizează modificări structurale într-un compus fără a-i modifica formula moleculară. În funcție de tipul de modificări, deosebim:

- Mutaze – transfer intramolecular al unei grupări chimice:



- Epimeraze și racemaze – modificări ale configurației atomilor de carbon asimetrici:



- Modificări funcționale, de exemplu cetoză ↔ aldoză:

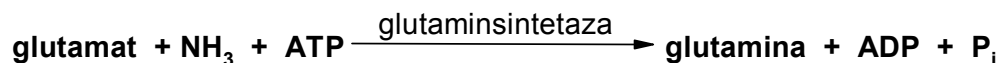


VI. Ligaze (sintetaze) – catalizează formarea de noi legături C–C, C–N, C–S, C–O, O–P, utilizând energia ATP. Ele catalizează formarea unor molecule mari prin combinarea unor molecule mai simple, cu formarea de legături covalente.

- Legătura C – C:



- Legătura C – N:



II. Utilizări ale enzimelor în medicină

1. Utilizare terapeutică

Enzimele sunt active în condiții fiziologice de pH și temperatură și pot fi astfel utilizate pentru eliminarea unor substanțe din organism. Utilizarea lor este limitată de distrugerea lor rapidă în organism. Distrugerea poate fi întârziată astfel:

- Modificare chimică (succinilarea asparaginazei crește existența acesteia în organism de la o oră la 17 ore);
- Încorporarea în vezicule artificiale numite lipozomi;
- Încorporarea în hematii;
- Cuplarea cu polietilenglicol.

Aplicații terapeutice ale enzimelor:

a) pentru aparatul digestiv:

1. pepsina – în hipo- și anaclohidrii, dispepsii iatrogene
2. proteaze, lipaze, α -amilaze – în colite, enterocolite, colecistopatii, meteorisme, dispepsii de fermentație, de putrefacție

b) medicație dermatologică și antiinflamatoare:

1. endopeptidaze + hialuronidaza degradează țesuturile alterate, existente la suprafața leziunii; este facilitată penetrația medicamentelor în profunzimea țesutului lezat; se asociază cu antibiotice, corticosteroizi.
2. hialuronidaza + heparina – accelerează resorbția soluțiilor injectate subcutanat, intramuscular; resorbția exudatelor, hematoamelor. **NU** se injectează în țesuturi infectate sau modificate neoplazic.
3. tripsina – favorizează vindecarea proceselor supurativ-necrotice, stimulează fagocitoza, inhibă hialuronidaza și penicilinaza, prelungește efectul antibioticelor, neutralizează toxine bacteriene. Este activată de Ca^{2+} și inhibată de heparină și tetraciline. Este indicată în: procese inflamatorii ale tegumentelor, leziuni necrotice sau purulente – arsuri, plăgi, fracturi deschise, ulcer varicos, fistule, ulceratii bucale.
4. chimotripsina (i.m.) – are acțiune antiinflamatoare puternică. Se recomandă în hematoame superficiale și profunde, entorse, edeme după fracturi, intervenții chirurgicale
5. collagenaza – îndepărtează colagenul din țesuturile necrozate.

c) medicație sanguină:

1. streptokinaza este utilizată ca agent anticoagulant în cazul infarctului, ea având rolul de activator al plasminei, enzimă ce va ataca fibrina, împiedicând formarea coagulului de sânge. Este indicată în infarct acut de miocard, tromboză venoasă profundă, embolie pulmonară masivă acută, trombozarea protezelor valvulare cardiace, ocluzii arteriale.
2. asparaginaza este folosită în terapia leucemiei, deoarece țesuturile tumorale au asparagina ca necesitate nutrițională. Utilizarea asparaginazei scade nivelul asparaginei din sânge, reducându-se astfel și viabilitatea tumorii.

În **industria farmaceutică**, enzimele, imobilizate pe suport în reactoare de sinteză, funcționează ca și catalizatori stereospecfici în realizarea unor compuși organici cu activitate biologică. De exemplu, prin trecerea laptelui printr-un reactor cu β -galactozidază, se hidrolizează lactoza din lapte, obținându-se lapte fără lactoză, aliment

necesar persoanelor cu intoleranță la lactoză. De asemenea în reactoare cu 11- β -hidroxilază și Δ -1,2 dehidrogenază, are loc conversia rapidă a unui precursor ieftin în prednisolon, agent medicamentos eficace în restabilirea funcțiilor organismului

Aplicații terapeutice ale inhibitorilor enzimatici

Un număr mare de inhibitori enzimatici au fost introduși în terapie sub formă de medicamente, unele fiind foarte cunoscute și având efecte semnificative în abordarea terapeutică dintr-o gamă variată de afecțiuni. Câteva asemenea exemple sunt prezentate în Tab:

Inhibitori enzimatici – substanțe active din diverse medicamente (denumiri comerciale)

Inhibitorul	Enzima țintă	Acțiune
Acid acetyl salicilic (Aspirină)	Ciclooxygenaza	Antiinflamator
Penicilina	Transpeptidaza bacteriană	Antimicrobian
β -aminopropionitril	Lisinoxidaza	În boli colagenice
Captopril (Lopril)	Enzima de conversie a angiotensinei	În HTA
Atorvastatine (Tahor)	HMG-CoA reductaza	În ateroscleroză
Allopurinol (Zycloric)	Xantin oxidaza	În gută
Sildenafil (Viagra)	GMP-fosfodiesteraza tip 5	În tulburări de erecție
Selegilin	Monoamin oxidaza tip B	În Parkinson
Finasterine (Chibproscar)	Testosteron 5 α -reductaza	Hiperplazie prostatică benignă
Omeprazol (Mopral)	H ⁺ , K ⁺ ATP-aza	Ulcer gastroduodenal
Ibuprofen	Prostaglandin sintetază	Procese inflamatorii
Metotrexat	Dihidrofolat reductaza	Cancer
Orlistat (Xenical)	Lipaza gastrointestinală	Obezitate

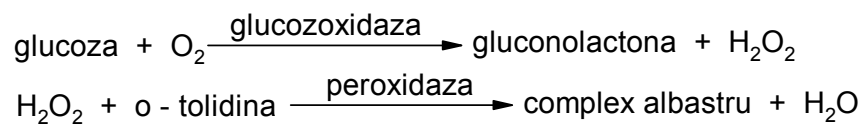
Alte exemple de inhibitori enzimatici cu efect nociv asupra organismului uman:

- sarin (gaz de luptă) - inhibă colinesteraza;
- derivații organofosforici (insecticide și gaz de luptă) - inhibă acetyl colinesteraza.

2. Enzime ca reactivi în analize de laborator clinic

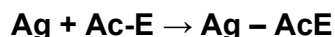
La ora actuală, majoritatea determinărilor de metaboliți organici se efectuează prin metode enzimactice ce utilizează ca reactivi enzime. Aceste metode sunt mult mai exacte decât cele chimice, datorită specificității deosebite a enzimei pentru substratul de determinat.

Enzimele imobilizate pe suport sunt utilizate în teste screening:



Tehnica ELISA

Este o analiză cu enzime legate de imunoabsorbanți și se utilizează pentru determinarea unor cantități foarte mici de antigen: 10^{-8} - 10^{-10} mol/l (hormoni, receptori, proteine virale, etc.). Reacția este:

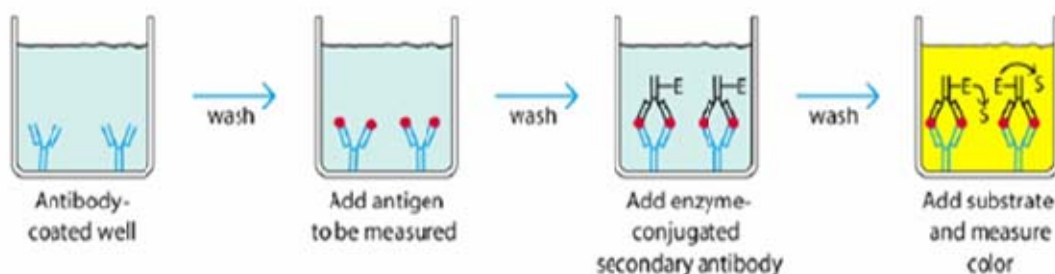


AC-E – enzimă legată de anticorp;

Ag – antigen de determinat.

Complexul format, Ag-AcE, se separă de restul de Ac-E și se incubează cu un substrat cromogen al enzimei. Intensitatea colorației este proporțională cu cantitatea de antigen.

(b) Sandwich ELISA



3. Enzime sintetice

Există trei categorii:

- Enzime semisintetice** – sunt *obținute prin modificarea chimică a enzimelor cunoscute*, modificări în urma cărora enzimele dobândesc noi proprietăți catalitice. Se utilizează în acest scop enzime cu structura primară și spațială cunoscută și ușor de obținut în stare cristalină pură. **Exemplu:** papaina este o enzimă proteolitică. Fixarea pe cale chimică a unei flavine în cisteina din poziția 2 anihilează activitatea proteolitică și dezvoltă o activitate oxidoreductazică neîntâlnită anterior. O altă metodă este *mutageneza controlată* prin care se modifică selectiv un aminoacid.
- Enzime sintetice** – sunt *structuri ciclice a căror structură spațială este analogă unui situs enzimatic*. Cele mai utilizate sunt polimerii ciclici ai glucozei: ciclodextrinele (α , β , γ , după numărul de resturi glicozilate 6, 7, 8).
- Abzime** – sunt *anticorpi cu funcție catalitică*. Sunt utilizați ca haptene ai unei structuri de tranziție a substratului. Exemplu: fosfaratul este starea de tranziție caracteristică legăturii esterice din lipide. Anticorpii obținuți se comportă ca niște lipaze, crescând viteza reacției de hidroliză de 10^3 - 10^5 ori. Se obține, de asemenea, o stereospecificitate de tip anomerice (metil-benzil-ester).

4. Utilizarea în diagnostic

Majoritatea enzimelor sunt sintetizate și funcționează intracelular, doar o mică parte sunt eliberate și funcționează în mediul extracelular. Acestea din urmă sunt de regulă secrete sub o formă inactivă (proenzimă), care trebuie activată înainte de a

acționa. Exemple din această a doua categorie sunt enzimele tractului digestiv și cele implicate în coagulare și fibrinoliză. Enzimele care acționează intracelular ajung în circulație în cantități mici, ca urmare a turnoverului celular normal. Accelerarea turnoverului celular (procese de creștere, regenerare, neoplazie), creșterea sintezei intracelulare de enzime (inducție enzimatică) sau leziunile celulare, determină creșterea activității plasmatice a acestor enzime.

Valoarea diagnostică a determinării activității enzimelor în ser (plasmă) constă în capacitatea de a elucida trei probleme majore:

- 1. Existența leziunii și extinderea ei** - datorită faptului că raportul activitate intracelulară: activitate plasmatică este între 1000:1 și 10000:1 pentru majoritatea enzimelor cu semnificație clinică, determinarea activității lor în ser are o mare sensibilitate, detectând chiar leziuni minore.
- 2. Identificarea țesutului (organului) lezat** - aceasta este de multe ori o problemă dificilă, deoarece puține enzime au specificitate strictă de țesut. În aceste situații este utilă determinarea izoenzimelor sau a izoformelor și folosirea unor combinații de enzime (de ex. creșterea simultană a ALP și GGT sugerează o boală hepatică, pe când creșterea ALP neînsoțită de o creștere a GGT orientează spre o afecțiune osoasă).
- 3. Dinamica activității enzimelor în evoluția bolii** - depinde de timpul de înjumătățire al enzimelor în circulație, cuprins între 3 ore (CK) și 170 de ore (ALP placentară).

Enzime serice de importanță clinică

Enzima	Țesut de origine	Valoare diagnostică
Fosfataza alcalină (ALP)	Ficat, os, placentă, intestin, rinichi	Afecțiuni osoase Boli hepato-biliare
Fosfataza acidă (ACP)	Prostată, os, eritrocite, trombocite	Carcinom prostatic
Alanin aminotransferaza (ALAT)	Ficat, mușchi scheletici, miocard, rinichi	Boli hepatice
Aspartat aminotransferaza (ASAT)	Ficat, miocard, mușchi scheletici, rinichi, eritrocite	Boli hepatice Infarct miocardic Afecțiuni musculare
Amilaza	Pancreas, glande salivare	Pancreatită acută
Lipaza	Pancreas	Pancreatită acută
Colinesteraza	Ficat	Intoxicație cu organofosforice Boli hepatice
Creatin kinaza (CK)	Mușchi scheletici, miocard creier	Infarct miocardic Afecțiuni musculare
Gama glutamil transferaza (GGT)	Ficat, rinichi, pancreas	Colestază Alcoolism
Lactat dehidrogenaza (LDH)	Ficat, miocard, rinichi, mușchi scheletici, hematii	Infarct miocardic Hemoliză Boli hepatice

4.1. Fosfataza alcalină (ALP)

Aceasta este o denumire generică pentru un grup de enzime care catalizează eliberarea fosfatului de pe o serie de substraturi și au activitate maximă la pH alcalin cuprins între 9,0-10,5. Substratul natural și rolul *in vivo* al ALP nu se cunosc. Indivizii cu deficit ereditar de ALP excretă cantități mari de fosfoetanolamină (fosfocolamină),

sugerând că acesta ar fi substratul natural. ALP este atașată membranelor celulare, posibil îndeplinind un rol în transportul transmembranar. În hepatocite se pare că ALP este localizată în membrana celulară din vecinătatea canaliculelor biliare și a capilarelor sinusoide. Este foarte răspândită, activitatea cea mai mare înregistrându-se în oase (osteoblaste), ficat, placentă și intestin. ALP este codificată de 4 gene pentru 4 izoenzime: intestinală, placentară, a celulelor germinative și forma nespecifică. Izoenzima celulelor germinative este prezentă în testicule și timus iar cea nespecifică conține enzimele din ficat, os și rinichi. Izoforma hepatică și cea osoasă diferă prin conținutul de acid sialic.

La adult, aproximativ jumătate din activitatea serică a ALP este de proveniență hepatică și cealaltă jumătate de proveniență osoasă. Doar o mică parte are origine intestinală.

Creșteri fiziologice ale activității ALP:

- Pe durata sarcinii, activitatea totală a ALP crește pe seama izoenzimei placentare.
- Activitatea ALP totale în ser prezintă variații fiziologice importante legate de vârstă, datorită creșterii activității osteoblastice în perioadele de creștere. Astfel, există două vârfuri ale activității ALP serice: primul în copilărie (aprox. de 2-3 ori LSN la adult), al doilea la pubertate (până la de 2 ori LSN). La persoanele în vârstă se observă valori ușor mai ridicate la femei.
- În urma unor mese bogate în grăsimi pot să apară creșteri tranzitorii ale ALP intestinale, de aceea recoltarea probelor de sânge pentru determinarea activității ALP se face dimineața, pe nemâncate.

Creșteri patologice ale activității ALP:

Afecțiuni hepato – biliare:

- Colestază: ca răspuns la obstrucția căilor biliare, crește sinteza ALP în hepatocite, la nivelul membranei adiacente canaliculelor biliare. O parte din ALP sintetizată trece în circulație. ALP crește în special în obstrucțiile extrahepatice (icter mecanic) atingând până la 5 ori LSN, fiind însoțită de creșterea altor enzime indicatoare ale colestazei: GGT, leucinaminopeptidaza (LAP) și 5'-nucleotidaza.
- Afecțiuni ale parenchimului hepatic: hepatită, ciroză, carcinom hepatocelular, tumorile hepatice metastatice. Creșterile sunt mai puțin marcate (până la 3 x LSN).

Afecțiuni osoase:

- Boala Paget (*osteitis deformans* sau osteodistrofia deformantă progresivă). Activitatea serică a ALP atinge cele mai mari valori în această afecțiune (10-25xLSN).
- Sarcomul osteogen
- Tumorile osoase metastatice
- Deficit de vitamina D (rahitism, osteomalacie). În osteoporoză valorile sunt normale.
- Hiperparatiroidism
- Procesul de vindecare după fracturi

Alte afecțiuni:

- Infarct intestinal, colită ulceroasă, ulcer gastric sau duodenal (izoenzima intestinală).
- Carcinom bronșic: acesta secretă o izoenzimă cu caracteristici similare izoenzimei placentare, numită izoenzima Regan, sintetizată datorită derepresiei genei ALP placentare.

Scăderi ale activității ALP apar în:

- Hipofosfatazie (deficit genetic de ALP).

Uneori, determinarea activității altor enzime alături de ALP poate fi mai utilă în precizarea diagnosticului decât analiza izoenzimelor ALP. Astfel, o creștere a ALP totale însoțită de creșterea concomitentă a GGT, 5'-nucleotidazei și LAP exclude practic afecțiunile osoase.

4.2. Fosfataza acidă (ACP)

Această denumire se referă la un grup de enzime care au activitate fosfatazică la un pH mai mic de 7,0. ACP se găsește în concentrații mari în prostată, osteoclaste, eritrocite și trombocite. Este prezentă și în splină, ficat, rinichi. Au fost identificate 4 gene care codifică cel puțin 5 izoenzime. Majoritatea ACP prezente în ser provine din osteoclaste și este legată de procesul de reînnoire a osului, activitatea ei fiind ridicată în perioadele de creștere. Izoenzima prezentă în osteoclaste este rezistentă la inhibiția cu tartrat.

Izoenzima prostatică este inhibată de tartrat dar nu și de formaldehidă, fiind utilă în diagnosticul carcinomului de prostată, deși actualmente importanța ei a scăzut în comparație cu antigenul specific prostatic (PSA), deoarece izoenzima prostatică nu crește în stadiile incipiente ale bolii. Valori crescute ale activității ACP în ser apar când tumora prostatică depășește capsula și în special când apar metastazele osoase. Este utilizată mai ales în monitorizarea eficacității tratamentului în cancerul de prostată.

Determinarea activității ACP este utilă și în diagnosticul bolilor Gaucher și Niemann-Pick, caracterizate prin teaurizarea sfinolipidelor în lizozomii macrofagelor SRE, acestea eliberând cantități crescute de ACP în circulație.

Celulele păroase din leucemia omonimă prezintă o ACP tartrat-rezistentă, dar aceasta nu pătrunde în plasmă, fiind evidențiată doar prin tehnici de citochimie.

ACP este prezentă în cantități crescute în lichidul seminal, având utilitate și în medicina legală.

4.3. Transaminazele:

- Glutamic-piruvic transaminaza (GPT) sau alanin aminotransferaza (ALAT, ALT)
- Glutamic-oxaloacetic transaminaza (GOT) sau aspartat aminotransferaza (ASAT, AST)

Sunt enzime ce catalizează interconversiunea aminoacizilor în α -cetoacizii corespunzători prin transferul grupării amino. Aceste enzime sunt larg răspândite în țesuturi.

ALAT se găsește în concentrația cea mai mare în ficat, existând în concentrații mai reduse și în mușchii scheletici, miocard și rinichi.

ASAT se găsește în concentrații descrescătoare în: miocard, ficat, mușchi scheletici, rinichi și hematii.

ALAT are localizare citoplasmatică, pe când ASAT are două izoenzime, una cu localizare mitocondrială și una citoplasmatică. În leziunile mai ușoare, apare în ser izoenzima citoplasmatică, pe când cea mitocondrială se găsește în leziunile severe.

Creșteri fiziologice ale ASAT se întâlnesc la nou-născuți și copii.

Probele hemolizate produc rezultate fals crescute.

Creșteri ale transaminazelor cu semnificație patologică:

- Bolile hepatice care decurg cu leziuni ale hepatocitelor (sindromul de citoliză hepatică) se însoțesc de creșteri ale activității ALAT și ASAT în ser. ALAT este enzima considerată a avea specificitate mai mare pentru ficat.

- În hepatita virală acută activitatea transaminazelor în ser este de regulă de 10-20 de ori LSN cu valori maxime între zilele 7-12. Ocazional creșterile pot atinge 100xLSN. Uneori aceste creșteri apar încă din perioada prodromală, înainte de apariția simptomelor, cum ar fi icterul. Unii clinicieni folosesc raportul ALAT/ASAT (normal <1) pentru a diferenția afecțiunile inflamatorii hepatice, de alte cauze ale necrozei hepatice. Astfel, în hepatite acest raport este >1 prin creșterea ceva mai marcată a ALAT (predomină leziunile inflamatorii, cu creșterea permeabilității membranei hepatocitelor și în ser apare ALAT și izoenzima citosolică a ASAT). În necrozele toxice raportul devine < 1 (prin eliberarea în circulație și a izoenzimei mitocondriale a ASAT). Creșteri foarte mari se întâlnesc în intoxicațiile cu solvenți organici (tetraclorură de carbon). Creșteri moderate apar după consumul de alcool (mai ales ASAT) și după administrarea unor medicamente (au fost semnalate sute de produse farmaceutice care determină creșteri ale transaminazelor serice: opiacee, neuroleptice, anticonvulsivante, anticoagulante, antibiotice, sulfamide, salicilați, paracetamol, etc). Valori extrem de ridicate (>10000 UI/L, ASAT>ALAT) se întâlnesc în sindromul alcool-acetaminofen (paracetamol).
- În hepatita cronică persistentă transaminazele sunt intermitent crescute iar în cea agresivă valorile sunt ridicate, dar nu ating nivelul din hepatita acută. La fel ca în hepatita acută ALAT>ASAT.
- În ciroze transaminazele pot fi normale sau prezintă doar creșteri ușoare în cursul puseurilor evolutive, datorită reducerii masei de hepatocite.
- În colestază pot să apară creșteri moderate ale transaminazelor.
- Carcinoamele hepatice primare nu determină modificări semnificative, în schimb metastazele tumorale hepatice pot produce creșteri moderate.
- Determinarea repetată a ASAT este utilă în detectarea rejetului după transplantul hepatic.
- Infarctul miocardic acut: activitatea ASAT crește în primele 6-12 ore de la debut, atinge valorile maxime după 20-30 de ore și se normalizează după 2-6 zile. Creșterile pot atinge 4-10 ori LSN. ALAT nu crește de regulă în IMA. O creștere a ALAT după un IMA sugerează o insuficiență ventriculară dreaptă cu stază hepatică.
- Afecțiuni musculare: distrofia musculară progresivă și dermatomiozita produc creșteri ale ASAT. În traumatisme severe (strivire) valorile ASAT pot atinge 10-15xLSN.

Creșteri ușoare sau moderate ale ASAT mai pot fi întâlnite în:

- Embolia pulmonară;
- Pancreatita acută;
- Gangrenă;
- Anemii hemolitice.

4.4. Gamaglutamiltransferaza (GGT, γ-GT)

Această enzimă catalizează transferul grupării γ-glutamil de pe un peptid pe un alt peptid sau pe un aminoacid. Este prezentă în majoritatea țesuturilor, excepție făcând mușchii scheletici. Concentrațiile cele mai ridicate se află în rinichi iar cantități importante se găsesc în ficat și pancreas. Enzima este localizată în cea mai mare parte la nivelul membranei celulare, jucând un rol în transportul transmembranar al AA. Doar o mică parte se găsește în citoplasmă.

Cu toate că cea mai mare cantitate de GGT din organism se află în rinichi, activitatea serică este determinată în primul rând de GGT din ficat, fiind crescută în afecțiunile hepatice. La fel ca și ALP, GGT este situată în hepatocite preponderent în membrana celulară adiacentă canaliculelor biliare și de aceea, cele mai mari creșteri se întâlnesc în obstrucția căilor biliare (5-30xLSN), având o sensibilitate mai mare decât ALP

în evidențierea colestazei. În schimb, GGT nu crește în afecțiuni osoase, ajutând la identificarea originii unor creșteri ale ALP. Creșteri moderate ale GGT apar în toate formele de hepatită, ciroză și neoplazii hepatice primare și metastatice.

Cauze ale creșterii activității serice a GGT

Afecțiuni hepato-biliare

- Colestază
- Ficatul alcoolic
- Hepatite
- Ciroză
- Neoplazii

Afecțiuni pancreatice

- Pancreatite
- Neoplasme

Alcoolism cronic

Medicamente

- Barbiturice (Fenobarbital)
- Anticonvulsivante (Fenitoin)
- Antibiotice (Rifampicină)

Alcoolul și unele medicamente determină creșterea activității serice a GGT prin creșterea sintezei hepatice a enzimei (inducție enzimatică). Majoritatea alcoolicilor prezintă valori crescute ale activității serice a GGT și acestea rămân crescute 2-3 săptămâni după încetarea consumului. Deși sensibilitatea și specificitatea GGT în depistarea alcoolismului nu sunt foarte ridicate, testul poate fi util în monitorizarea consumului de alcool.

4.5. Creatin-kinaza (CK)

Această enzimă catalizează fosforilarea reversibilă a creatinei, cu formarea unui compus macroergic, creatin-fosfatul. Concentrații mari ale CK se găsesc în mușchii scheletici, miocard și creier. Enzima este un dimer alcătuit din două tipuri de subunități polipeptidice, B și M, fiecare având masa moleculară de 40000. Din combinarea acestor subunități rezultă trei izoenzime: CK-BB (CK1), CK-MB (CK2) și CK-MM (CK3). CK-MM mai prezintă și trei izoforme descrise anterior.

CK-BB se găsește în creier, prostată, intestin, plămâni, uter, placentă și tiroidă, CK-MM se găsește în mușchii scheletici și miocard iar CK-MB se găsește în proporție mai mare în miocard (25 - 46%) și mult mai puțin în mușchii scheletici (< 5%). Proporția CK-MB din mușchii scheletici poate să crească până la 15% la atleți în timpul antrenamentelor sau în unele afecțiuni musculare. În mod normal izoenzima CK-BB nu traversează bariera hemato-encefalică, nefiind prezentă în ser la subiecții normali. Uneori poate să apară în ser, în traumatisme cranio-cerebrale, sindrom Reye (afecțiune acută și severă, de cauză necunoscută, întâlnită la copii și asociată infecțiilor virale, mai ales celor tratate cu aspirină, caracterizată prin leziuni ale SNC și încărcare grasă a celulelor hepatice și tubulare renale) sau în unele tumori maligne pulmonare, uterine, ale vezicii urinare, prostatei, dar nu prezintă o mare importanță diagnostică.

La persoanele sănătoase, 96-100% din activitatea CK total în ser este dată de CK-MM și depinde în primul rând de masa musculară a persoanei. Exercițiile fizice intense, mai ales la persoane neantrenate, determină creșteri ale CK. Variațiile fiziologice mai sunt legate de rasă (negrii prezintă valori normale de 2-3x mai ridicate) și de sex (mai mari la bărbați, dar probabil tot în legătură cu masa musculară). Nașterea poate produce creșteri

moderate ale CK . De asemenea nou-născuții, în special prematurii, prezintă și ei valori crescute ale CK.

Cauze ale creșterii activității CK în ser

Fiziologice

- Nou-născuți
- Populație de culoare
- Masă musculară mărită
- Efort muscular intens
- Naștere

Patologice

Cardiace

- IMA
- Operații pe cord deschis
- Defibrilare
- Miocardite severe

Musculare

- Rabdomioliză
- Distrofie musculară
- Dermatomiozită, polimiozită
- Hiperpirexia malignă
- Traumatisme musculare
- Intervenții chirurgicale
- Injecții intramusculare

Altele

- Accidente vasculare cerebrale
- Traumatisme cranio-cerebrale
- Sindrom Reye
- Crize de epilepsie
- Delirium tremens
- Hipotiroidism
- Cancer de prostată, vezică urinară, uter
- Hipotermie

Medicamente

- Antifibrinolitice (Acid aminocaproic)
- Antifungice (Amfotericina B)
- Antidepresive triciclice (Amitriptilina)
- Antiulceroase (Carbenoxolone)
- β – blocante (Pindolol)
- Hipocolesterolemizante: Clofibrate, inhibitori ai HMG-CoA reductazei („statine”: Simvastatin, Lovastatin, etc.)
- Neuroleptice (fenotiazine: Chlorpromazine)
- Droguri: - Heroină
 - Cocaină
 - Amfetamină
 - Metilen dioximetamfetamină (MDMA, “Ecstasy”)

Determinarea activității serice a CK este utilizată în primul rând în diagnosticul infarctului miocardic acut și a unor afecțiuni musculare, determinarea izoenzimelor (mai ales CK-MB) servind diagnosticului diferențial.

În IMA, CK totală crește după 4-8 ore de la debut, atinge activitatea maximă după 18-30 de ore și revine la normal în 3-4 zile. CK-MB crește mai rapid, după 3-8 ore de la debut, cu maximum la 12 - 24 de ore și normalizare după 2 - 3 zile.

În afecțiunile musculare, activitatea CK este crescută în traumatisme, rabdomioliză (poate depăși 200x LSN), distrofii musculare, polimiozită, dermatomiozită, miopatia alcoolică, dar este de regulă normală în miopatii neurogene (poliomielită, nevrite periferice, afecțiuni ale neuronilor motori). În distrofia musculară Duchenne, (boală ereditară cu transmitere recesivă legată de cromozomul X), activitatea serică a CK începe să crească înaintea apariției semnelor clinice fiind un test foarte util în depistarea bolii. De asemenea, aproximativ 75% din femeile purtătoare ale genei distrofiei musculare Duchenne prezintă creșteri ale activității serice a CK. O serie de medicamente pot determina creșteri ale CK, în special pe seama CK-MM.

4.6. Amilaza (Amyl)

Amilaza catalizează hidroliza amidonului. Este o enzimă cu masă moleculară relativ mică (55-60000 Da) care provine din pancreas și glandele salivare (o activitate mult mai redusă există și în ovare, trompe uterine, intestine, mușchi scheletici și plămâni). Izoenzimele pancreatice și salivare sunt codificate de gene înrudite, fiecare prezentând mai multe variante alelice (6 pancreatice și 12 salivare). Aceste izoenzime pot fi diferențiate prin metode electroforetice, imunologice sau prin utilizarea unor inhibitori specifici (o proteină din grâu care inhibă izoenzimele extrapancreatice). Datorită mărimii relativ mici a moleculelor, *amilaza este filtrată glomerular și apare în urină*. Uneori, amilaza formează în ser complexe cu proteine cu masă moleculară mare (de ex. Ig), ceea ce determină reducerea clearance-ului și creșterea activității serice a amilazei până la 6-8x LSN, fenomen fără conotații patologice, numit macroamilazemie.

Determinarea activității amilazei serice este utilizată mai ales în diagnosticul pancreatitei acute, în care amilaza serică începe să crească la 2-12 ore de la debut, atinge valoarea maximă după 24 de ore și revine la normal în 3-5 zile. Cu cât valorile sunt mai ridicate, cu atât probabilitatea diagnosticului de pancreatită acută este mai mare (la valori de peste 10x LSN, diagnosticul este aproape cert). De menționat că amilaza serică poate fi normală în aproape 20% din cazurile de pancreatită acută. Alte situații care determină creșterea activității amilazei în ser sunt prezentate mai jos.

Clearance-ul amilazei și activitatea amilazei în urină sunt folosite uneori în diagnosticul pancreatitei acute. Clearance-ul amilazei se exprimă în raport cu clearance-ul creatininei și se calculează după formula:

$$\frac{\text{Amilaza urinară}}{\text{Amilaza serică}} \times \frac{\text{Creatinina serică}}{\text{Creatinina urinară}} \times 100$$

Valorile normale ale acestui raport sunt cuprinse între 1-4%.

În pancreatita acută, reabsorbția tubulară a amilazei (și a altor proteine) este scăzută și clearance-ul este crescut. După unele studii, acesta este un test cu sensibilitate mai mare decât amilaza serică.

Cauze ale creșterii activității serice a amilazei

Afecțiuni pancreatice

- Pancreatită acută
- Pseudochist pancreatic
- Traumatism al pancreasului
- Carcinom pancreatic

Afecțiuni ale căilor biliare

- Litiază biliară
- Colecistită acută

Alte afecțiuni abdominale

- Ulcer perforat
- Ocluzie intestinală
- Peritonită
- Sarcină ectopică ruptă

Cetoacidoză diabetică**Insuficiență renală****Macroamilazemie**

Medicamente: opiacee

Afecțiuni ale glandelor salivare

- Parotidită epidemică
- Obstrucția prin calculi a canalului Stensen

Carcinoame bronhopulmonare sau ovariene**4.7. Lipaza**

Catalizează hidroliza triacilglicerolilor și este prezentă în concentrații mari în pancreas. Deoarece 20% din pacienții cu pancreatită acută pot avea amilază serică normală, determinarea activității lipazei serice se folosește ca investigație suplimentară în această afecțiune. În plus, lipaza serică este normală în afecțiunile glandelor salivare și crește mai rar în afecțiuni abdominale cum ar fi ulcerul perforat.

4.8. Colinesteraza

Sub această denumire sunt grupate enzime ce catalizează hidroliza esterilor colinei cu diverși acizi organici. Există două tipuri de colinesterază:

a) Acetilcolinesteraza (colinesteraza I sau colinesteraza „adevărată”), care hidrolizează acetilcolina și se găsește în terminațiile nervoase, eritrocite, substanța cenușie a creierului, splină și plămâni. Colinesteraza I nu apare în ser.

b) Acilcolinesteraza (colinesteraza II sau “pseudocolinesteraza”), care hidrolizează acetilcolina, dar și alți esterai ai colinei (butirilcolina, benzoilcolina, succinilcolina, etc.) și se găsește în ficat, pancreas, inimă și substanța albă a creierului. Colinesteraza II de origine hepatică este prezentă în ser.

De utilitate clinică este mai ales determinarea activității colinesterazei serice (colinesteraza II), dar și a colinesterazei eritrocitare (colinesteraza I). O serie de cauze ce pot produce scăderea activității colinesterazei serice sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Gena care controlează sinteza colinesterazei II există în mai multe variante alelice: E_1^u , E_1^a , E_1^f și E_1^s .

- E_1^u codifică forma uzuală, fenotipul cel mai răspândit fiind homozigoții $E_1^u E_1^u$ (UU).
- E_1^a codifică o colinesterază atipică, care nu hidrolizează majoritatea substraturilor și este rezistentă la inhibiția cu dibucaină.
- E_1^f codifică o enzimă cu activitate redusă și rezistentă la inhibiția prin fluorură.
- E_1^s codifică o proteină “ silențioasă”, fără activitate colinesterazică.

Utilizarea succinilcolinei (suxametoniu) în anestezie, pentru relaxarea musculaturii striate, la indivizi cu variante anormale (fenotip AA, AS, FF, FS, SS, AF sau chiar UA) poate produce o apnee prelungită, deoarece hidroliza succinilcolinei este întârziată sau chiar absentă. De aceea, la pacienții la care se intenționează administrarea acestui compus, pe lângă determinarea activității succinilcolinei, este necesară și testarea efectului inhibitor al dibucainei și fluorurii.

Cauzele scăderii activității colinesterazei serice

Fiziologice

- Trimestrul III de sarcină
- Copii, în primele 6 luni

Patologice

- Anomalii genetice-colinesteraze anormale
- Intoxicația cu insecticide organofosforice (Parathion)-inhibă colinesteraza
- Boli hepatice-sinteză redusă

Medicamente (contraceptive orale, IMAO)

Activitatea colinesterazei eritrocitare este scăzută mai ales în intoxicațiile cu organofosforice, iar în formele cronice este mai utilă decât colinesteraza serică.

4.9. Lactat dehidrogenaza (LD, LDH)

LDH catalizează oxidarea reversibilă a L-lactatului la piruvat. LDH este foarte răspândită, fiind prezentă în aproape toate țesuturile, dar mai ales în ficat, miocard, rinichi, mușchi scheletici, eritrocite, plămâni, etc.

Este un tetramer alcătuit din două tipuri de subunități, H și M. Se cunosc 5 izoenzime: LDH₁ (H₄), LDH₂ (H₃M), LDH₃ (H₂M₂), LDH₄ (HM₃) și LDH₅ (M₄).

- LDH₁ și LDH₂ predomină în miocard, eritrocite și rinichi.
- LDH₃ se găsește mai ales în plămâni, splină, pancreas și placentă.
- LDH₄ și LDH₅ își au originea în ficat și mușchii scheletici.

Izoenzimele pot fi separate prin electroforeză (LDH₁ și LDH₂ migrează rapid spre anod iar LDH₄ și LDH₅ migrează lent) sau diferențiate pe baza unor proprietăți fizice (LDH₁ e termostabilă, LDH₅ e termolabilă), chimice (LDH₁ are afinitate mai mare pentru α -hidroxibutirat, fiind denumită și α -hidroxibutirat dehidrogenază) sau folosind anticorpi specifici.

Activitatea serică a LDH (LDH totală) are specificitate redusă și este crescută într-o serie de afecțiuni:

- Infarctul miocardic acut: crește mai târziu decât CK și ASAT și revine la normal doar după 8-14 zile, fiind uneori utilă în cazurile care se prezintă la medic după câteva zile (>36 ore) de la episodul dureros (deși actualmente este preferată determinarea troponinei).
- Infarctul pulmonar: LDH crește în primele 24 de ore, înaintea ASAT.
- Afecțiuni hepatice: necroze toxice, hepatite virale, ciroză.
- Anemii: megaloblastice, hemolitice.
- Neoplazii: boala Hodgkin, leucemii, cancere pulmonare, abdominale, seminoame, teratoame testiculare, etc. LDH se folosește și pentru a diferenția o pleurezie neoplazică de alte pleurezii (în cele neoplazice LDH în lichidul pleural > LDH serică).
- Afecțiuni musculare: distrofii musculare, traumatisme.
- Pancreatită acută.
- Infarct renal.

Creșteri ale activității serice a LDH se pot datora și altor cauze:

- exerciții fizice intense.
- naștere.
- hemoliza *in vitro*.
- afecțiuni dermatologice.
- medicamente (β -blocante, cefalosporine, oxacilină, tetraciclină, biseptol, aspirină, etc.).

De o mai mare utilitate clinică este investigarea izoenzimelor LDH, care poate furniza unele informații despre originea leziunilor. Procentajul normal al celor 5 izoenzime este: LDH₁= 17-27%, LDH₂= 29-39%, LDH₃= 19-27%, LDH₄= 8-16% și LDH₅= 6-16%. În diverse afecțiuni se produce alterarea acestei distribuții în funcție de țesutul afectat:

Creșterea LDH₁ și LDH₂ (mai ales a LDH₁, cu inversarea raportului LDH₁ / LDH₂) apare în:

- IMA: izoenzimele “cardiace” încep să crească la 8-12 ore de la debut, ating valorile maxime după 48-72 de ore și revin la normal după 8-14 zile.
- Anemii megaloblastice.
- Anemii hemolitice.
- Infarct renal.

Creșterea LDH₃ apare în:

- Limfoame maligne, leucemii și alte neoplazii, în special în stadiile mai avansate (excepție face seminomul, în care crește LDH₁). De regulă nivelul LDH scade în cazurile tratate cu succes, fiind un indicator al eficacității terapiei.
- Infarct pulmonar.
- Pneumonie.
- Pancreatită acută.

Creșterea LDH₄ și LDH₅ (în special a LDH₅) are loc în:

- Afecțiuni hepatice.
- Traumatisme musculare.