



Biochimica Clinica + Biologia Molecolare Clinica

Biochimica Clinica (Università degli Studi di Urbino Carlo Bo)



Scansiona per aprire su Studocu

BIOCHIMICA CLINICA

BENESSERE.

Lo stato di benessere e di salute di un soggetto tiene conto di diversi tipi di aspetti: bisogni affettivi, sanitari, educativi e sociali; questi riguardano l'essere umano in sé. Noi prendiamo in considerazione gli aspetti alimentari, sanitari e sociali. Lo stato di benessere di un soggetto è fatto di due componenti: microambiente e macroambiente.

Il **macroambiente** è tutto ciò che permette a quell'individuo di avere un'espressione proteica, enzimatica e molecolare specifica. Un esempio è l'esperimento effettuato su due gemelli: uno è stato mandato nello spazio e l'altro è rimasto sulla terra: i due gemelli hanno un profilo genetico totalmente identico, ma gli sperimentatori hanno visto l'espressione dell'RNA messaggero di moltissime molecole e hanno visto che la persona che è stata nello spazio aveva un profilo di espressione dell'mRNA totalmente diverso rispetto a quello del suo gemello. Quindi ciò significa che il livello sociale, ovvero il macroambiente, è stato in grado di modificare il microambiente.

Gli stimoli a cui l'organismo va incontro possono essere **nocivi o tossici**. I tossici creano un ambiente ostile per la crescita e la modifica cellulare, i nocivi creano un danno, reversibile o irreversibile, a cui l'organismo deve reagire. Qualsiasi tipo di stimolo permette all'organismo di avere una risposta. Gli stimoli possono essere esogeni ed endogeni.

Stimoli esogeni: Virus, batteri, parassiti, pollini ecc. Le manipolazioni degli alimenti, le sostanze chimiche (conservanti, diserbanti, coloranti, ecc), i farmaci, i campi di disturbo sia geologici (inquinanti chimici, elettrici, elettromagnetici ecc) che marini (alterato ecosistema), che cosmici (radiazioni, raggi UV ecc.), le nanoparticelle, i radicali liberi dell'ossigeno (stress ossidativo).

Tra gli **stimoli endogeni** nella maggior parte dei casi abbiamo stimoli tossici (erronee abitudini alimentari, erronei stili di vita, non rispetto dei ritmi biologici, predisposizione genetica) ovvero quegli stimoli che creano una condizione sfavorevole (guarda caso sono proprio quelli del macro e microambiente). Del macroambiente sono gli erronei stili di vita: fumo, abuso di alcol, droghe e quant'altro, gli altri sono invece le abitudini alimentari, che possono essere eccessi di carattere quantitativo.

Una dieta non significa mai restrizione, ma per dieta si intende un'alimentazione bilanciata. Non è mai una limitazione di alcune componenti, ma ovviamente ognuno di noi presenta un diverso fabbisogno.

Il rispetto dei ritmi biologici, della corretta alimentazione portano ad un corretto equilibrio fisiologico del nostro organismo chiamato **omeostasi**.

Quando prendiamo in esame la salute prendiamo anche in esame il concetto di malattia. Il concetto di malattia può essere orientato sia dal punto di vista fisico che dal punto di vista mentale o psicologico.

Quando parliamo di malattie fisiche possiamo parlare di quelle funzionali ed organiche. Quando parliamo di una **malattia fisica funzionale** parliamo di un sistema che non permette a quel particolare tessuto di quell'organo di avere la giusta funzionalità. Per esempio il colon irritabile: il colon ha uno stato infiammatorio di tipo cronico ma è la funzionalità che non va. Il colon dal punto di vista cellulare è perfetto, ma è funzionalmente non corretto. Ciò comporta che dal punto di vista della malattia esso è un organo che funziona male, ovvero che avrà infiammazione e provocherà dei problemi funzionali (errata fisiologia).

Quando parliamo invece di **malattia fisica organica** abbiamo un danno dell'organo, delle cellule. L'ulcera, per esempio, è un danno in cui si ha morte cellulare: si ha perdita dell'integrità di quel tessuto, il quale non è più riconoscibile fisiologicamente e dal punto di vista anatomico perfetto ed integro, bensì c'è un danno che poi a cascata provoca altre conseguenze.

Quando parliamo, invece, di patologie di tipo mentale bisogna distinguerle su vari aspetti. Ci sono le **malattie mentali organiche** come ad esempio le malattie neurologiche (Parkinson, sclerosi) e le **malattie mentali psicologiche** che invece indicano solamente una perdita funzionale, per esempio la perdita cognitiva, l'incapacità della memoria.

Complessità di una malattia: quanto organi diversi tra di loro possono interloquire. Ciò si chiama cross talk, cioè quando diversi organi parlano in maniera incrociata quando si hanno delle malattie complesse quali per esempio le malattie psicosomatiche.

La biochimica clinica è una branca della medicina di laboratorio. Essa prende in esame l'enzimologia, ovvero gli enzimi capaci di prendere parte alle reazioni trasformando delle sostanze in un prodotto terminale diverso da quello di partenza, la biologia molecolare clinica, che comprende la proteomica, trascrittomica, lipidomica, metabolomica e nutrigenomica. Omica è il suffisso che fa comprendere diversi tipi di approcci. Quando noi parliamo di proteomica, non analizziamo solo la molecola proteica, ma andiamo a valutare tutto ciò che incide su quella molecola proteica: trasformazione, la traduzione post trascrizionale, le sue glicosilazioni e così via...

Ogni volta che andiamo a fare un'analisi di questo genere le possibilità sono: **diagnostiche, prognostiche o di ricerca**. Ci sono delle analisi richieste per benefici di tipo diverso ad esempio solo per il singolo paziente o per il collettivo. Le prime servono per capire come il paziente sta e come potrebbe stare in futuro. Le seconde, come per esempio i vaccini, riguardano tutti perchè nonostante essi vengano fatti ad un singolo paziente, con l'effetto cupola si consente anche alle persone non vaccinate di essere protette dalla malattia (*immunizzazione da gregge*). Se questo effetto viene a mancare allora le persone che non possono vaccinarsi avranno maggiori possibilità di contrarre una malattia infettiva.

Quando facciamo delle analisi possiamo avere una moltitudine di campioni. Per la maggior parte si usa il **sangue** perchè tutti gli organi danno un contributo alla sua composizione: ciò che ritroviamo al suo interno ci permette di capire orientativamente la funzionalità degli organi. È ovvio che i campioni di sangue possono essere molto diversi, può essere *venoso* in cui troviamo quasi tutti i parametri degli organi, o *arterioso* in cui troviamo tutto quello che è ossigenato ovvero tutto ciò che fa parte del distretto dello scambio gassoso polmonare (si può valutare l'equilibrio acido-base, tutto il sistema del rapporto O₂ e CO₂ e i valori del PH).

Oltre al sangue possono anche essere analizzate le **urine**. Esse fanno parte dell'emuntorio renale: se all'interno delle urine troviamo dei componenti ancora utili all'organismo significa che vi è la possibilità di un danno renale o di un errata filtrazione da parte dei reni (es. un allargamento delle maglie permette il passaggio a tutto ciò che si dovrebbe trattenere) oppure di un organo alterato funzionalmente che produce più sostanza di quello che dovrebbe e quindi il rene non è capace di assorbire tutto.

La **soglia renale** è la concentrazione limite di una sostanza oltre la quale essa non viene più completamente riassorbita dall'epitelio dei tubuli renali e quindi viene eliminata attraverso le urine e viene rilevata. La soglia renale è diversa per le varie sostanze che filtrano e dipende anche dalla concentrazione che la sostanza raggiunge nel plasma. Inoltre è possibile effettuare delle colture delle urine per capire se ci sono delle presenze batteriche o virali che possono essere presenti nell'ultimo tratto della vescica, nei reni o addirittura nell'apparato sistemico (è possibile anche fare la coltura delle urine relative alle 24 ore e questo ci permette di capire la neurofunzionalità del rene durante un'intera giornata). La **clearance renale** è la valutazione di ciò che il rene rilascia nelle urine durante le 24 ore.

Anche nelle **feci** sono da ricercare parametri come il sangue occulto, batteri e parassiti e sindromi di malassorbimento per valutare la funzionalità dell'intestino. Esistono poi un insieme di liquidi biologici che si trovano in una serie di strutture cavitare e sono quelle che rivestono particolari organi come le membrane sinoviali ovvero delle membrane che stanno intorno a tutti i nostri componenti osteo-articolari. Se all'interno di queste membrane c'è poco liquido si tende a provare dolore durante il movimento, se invece si infiamma allora si accumula del liquido, chiamato **liquido sinoviale**, che genera dei rigonfiamenti e dolori alle ginocchia e alle caviglie (campione prelevato con ago e analizzato). Esiste inoltre il **liquido cefalo rachidiano**: esso è un fluido corporeo che si trova nel sistema nervoso centrale (SNC) e ha, tra le varie funzioni, quella di ridurre il peso dell'encefalo e di consentirne la perfusione a pressioni costanti trovandosi al di sopra della pompa cardiaca.

Di solito viene estratto tramite una procedura chiamata puntura lombare (nella zona più bassa dei lombi, dove non ci sono più terminazioni nervose) che serve per contare il numero di cellule presenti nel fluido; per osservare dei corpi che non dovrebbero essere presenti, come i globuli rossi, e per misurare i livelli di proteine, glucosio e altre sostanze. Questi parametri da soli sono molto indicativi nella diagnosi.

Anche il **liquido seminale** va analizzato per l'infertilità dell'uomo. Vengono applicate delle indagini di tipo molecolare sulle componenti biochimiche e metaboliche di questo liquido.

Ogni volta che parliamo di indagini parliamo di marcatori. Attualmente non esiste un marker univoco e perciò vengono utilizzati degli iter per poter valutare la specificità, la sensibilità e la prevedibilità. Questi sono parametri importanti perchè ci aiutano a capire quanto ci possiamo fidare di quei marcatori. Possiamo notare la differente attività del marcatore con due popolazioni: una sana e una patologica. Il **Cut-off** rappresenta il valore soglia in grado di indicarci i valori normali e i valori anormali. Viene definito facendo le analisi ad una popolazione sana molto ampia, dai dati ottenuti si trova la media dei valori, ottenendo così un valore di riferimento, e si traccia una linea di sensibilità e di specificità. Un valore al di sopra del valore soglia non indica necessariamente la presenza di malattie: esistono delle condizioni in cui un parametro con un valore anormale non è legato alla malattia ma potrebbe essere legato a delle condizioni di stress.

Quando definiamo i parametri definiamo 3 caratteristiche:

- **sensibilità** ovvero la capacità di individuare i soggetti che presentano realmente la malattia
- **Specificità**: la capacità di individuare persone realmente sane. Specifico per l'assenza della malattia.

Gli altri sono valori che possono essere diagnostici o prognostici:

- Il **valore diagnostico** aiuta per la diagnosi
- il **valore prognostico** aiuta per i progressi della malattia.

Per poter fare questo tipo di valutazione si ha bisogno di alcune formule che servono per capire quanto la popolazione malata si distingue dalla popolazione sana. Permettono di distinguere il positivo dal negativo, il vero dal falso. Ovviamente bisogna comprendere cosa può aver alterato il valore facendo riferimento alla variabilità che può essere di tipo analitico o biologico.

- **Variabilità biologiche**, che si distinguono in *cause genetiche* e *cause non genetiche*: esercizio fisico, assunzione di cibo, caffè ecc...
- **Variabilità analitiche**: impiego del controllo di qualità "campioni a titolo noto" che vengono processati insieme e nelle stesse condizioni dei campioni del paziente.
 - -pre-analitiche: tutte le cause di errore delle fasi che precedono le analisi, dipendono dalla preparazione del paziente e dall'adeguatezza del prelievo.
 - -post analitiche: tutti gli errori compiuti dopo l'esecuzione dell'indagine.

Bisogna tener conto di tutte le variabili: post analitica, preanalitica, intra individuale.

Si può ricavare la variabilità totale che si valuta attraverso la campana di Gauss: questa ci permette di stabilire ai due lati, a destra e a sinistra le minori frequenze, e la parte centrale quella a maggior frequenza. Bisogna tener conto che essa non è sempre centrale, ma può avere una distribuzione per code, con valori più alti da un lato e più bassi dall'altro (distribuzione di popolazione). Quando il grafico non è centrale allora avremo che il valore medio non è centrale, quindi avremo la mediana e non la media. Ci aiuta a capire se stiamo analizzando una popolazione omogenea o disomogenea. La variazione analitica è data dall'errore. L'analisi di un campione fornisce la stima di una grandezza (massa, concentrazione, numerosità ...).

L'entità dello scostamento tra valore misurato e valore vero è definita **ERRORE TOTALE DELLA MISURA**.

ERRORE CAUALE → differenza tra valore analitico e valore reale, che si presenta in maniera irregolare, apparentemente non correlata a specifiche azioni, con aumenti/diminuzioni non consecutivi e con dimensioni quantitative incostanti (risultati sistematicamente distribuiti intorno il valore centrale).

ERRORE SISTEMATICO → differenza tra valore analitico e valore reale, che si presenta in maniera regolare, con aumenti/diminuzioni consecutivi di entità costante o progressivamente proporzionali (risultati sistematicamente superiori/inferiori al valore vero).

Un campione può essere emolizzato ovvero vi è un passaggio nel siero o nel plasma dell'emoglobina e di tutte le sostanze contenute all'interno degli eritrociti. Esistono diversi tipi di emolisi

- emolisi osmotica o chimica
- emolisi meccanica
- emolisi fisica
- emolisi da cause biologiche

LEZIONE 2

LA BIOCHIMICA CLINICA DEL RENE: BILANCIO IDRO-ELETTROLITICO.

FUNZIONALITÀ RENALE ED ESAME DELLE URINE.

Per **bilancio idro-elettrolitico** si intende l'importanza del volume dell'acqua e di ciò che vi è disciolto, all'interno del proprio organismo.

Nell'arco della vita di un individuo l'esigenza di accumulare la quantità di acqua all'interno del proprio sistema cambia. Nelle condizioni iniziali, a livello embrionale o fetale, la quantità di acqua è molto più elevata rispetto a quella che c'è in età adulta o senile; ciò perché le funzioni cellulari sono connesse alla quantità di acqua. Qualsiasi reazione biochimica metabolica del nostro organismo dipende dal contenuto di acqua. Più noi limitiamo queste condizioni più la funzione cellulare viene meno, ciò significa che durante la parte evolutiva dell'organismo si ha un fisiologico depauperamento del contenuto di acqua. Questo porta ad un avvizzimento dei nostri tessuti ma anche ad una minor funzionalità dei tessuti stessi.

L'acqua può essere presente sia sotto forma di acqua vera e propria (fluido intracellulare 2/3) oppure sotto forma di matrice extracellulare (1/3). Qualsiasi matrice extracellulare se non presenta un'adeguata quantità di acqua provoca l'avvizzimento dei tessuti, quindi l'incapacità da parte del tessuto di avere una propria forma, funzionalità e sostegno. Tutto ciò porta ad avere un bilanciamento (omeostasi) idro-elettrolitico tra le entrate: ciò che l'organismo immette come contenuto idrico (tutti gli alimenti, tutte le bevande) (2 litri al giorno) e ciò che viene prodotto durante la fase metabolica. Ovviamente questo è un numero indicativo in quanto dipende dal fabbisogno, dall'attività fisica, dalla temperatura esterna e quant'altro.

Per controbilanciare l'entrata idrica abbiamo anche le uscite idriche rappresentate dal consumo, dalla perdita e dall'eliminazione di acqua. Esiste anche la perdita insensibile di acqua che avviene attraverso la cute e l'atto respiratorio; quest'ultima in particolare è facilmente visibile quando la temperatura esterna è molto più bassa e noi abbiamo la sensazione dell'emissione di vapore. La cute, invece, per quanto possa sembrare asciutta in realtà è sempre umida e funge da barriera e da lubrificante per la termoregolazione del nostro sistema tissutale.

Esistono poi due componenti organiche, renale e intestinale, che permettono di espellere una grande quantità di volume di liquidi attraverso le feci e le urine (possono arrivare fino a un 1- 1 e ½ nell'arco della giornata).

Attraverso la perdita insensibile e le urine noi normalmente eliminiamo circa due litri di acqua al giorno, per questo è consigliabile assumere circa un litro e mezzo di acqua al giorno.

FABBISOGNO DI ACQUA: Il fabbisogno d'acqua è dato dal bilanciamento. Al suo interno ci sono dei limiti: è possibile non mangiare ma non non bere, perché una perdita di liquidi superiore al 20% può portare ad una serie di cause tra cui uno stand by del cervello o la morte cellulare. Questo fabbisogno varia con l'età: un anziano o un neonato presentano un fabbisogno che con perdite al di sotto del 10% può essere mortale. Quindi anche se può essere fatto un discorso generico bisogna poi tener conto sempre dell'età dell'individuo.

I due eccessi sono la **disidratazione** e la **iperidratazione**.

Disidratazione significa insufficiente introduzione di acqua nell'organismo. Iperidratazione significa eccessiva introduzione di acqua all'interno dell'organismo e tanto quanto la disidratazione può provocare dei problemi alla fisiologia dell'organismo. I problemi di disidratazione sono più gravi perché connessi ad una diminuzione metabolica e alla perdita cognitiva, mentre per quanto riguarda la iperidratazione è più semplice porre rimedio.

Con la disidratazione diventa più complesso reintrodurre acqua: non è sufficiente dare acqua ad un soggetto disidratato, ma bisogna idratare i propri tessuti. Inoltre nell'inserire nuovamente acqua bisogna anche regolare i soluti con un bilanciamento omeostatico ben preciso.

ACQUA ED ELETTROLITI: Quando andiamo a guardare le porzioni di acqua sia all'interno che all'esterno dei tessuti vediamo che esse sono legate alla permeabilità dei vasi sanguigni. I vasi sanguigni sono sistemi chiusi ma che permettono alle sostanze di entrare ed uscire. Essi sono quindi permeabili ma si basano su condizioni di membrana cellulare che ha di per sé caratteristiche semipermeabili. Ciò aggiunge una selettività tra gli scambi tra l'ambiente esterno ed interno. Questo produce un diverso tenore e una diversa velocità di scambi di liquidi, di sostanze organiche ma anche degli elettroliti. Tutte queste sostanze per poter passare hanno un sistema di regolazione che è legato, anche se non in maniera unica, al peso molecolare della sostanza: più il peso molecolare della sostanza è piccolo, più è facilitato il passaggio; più il peso molecolare è di grandi dimensioni, più sarà difficile il passaggio spontaneo.

Ciò significa che tutte le molecole organiche, come ad esempio le proteine, potranno passare attraverso il sistema dei nostri vasi sanguigni a seconda del loro peso molecolare: tutto ciò che circola all'interno di un vaso sanguigno, arterioso o venoso, contiene le proteine plasmatiche, l'80% di queste proteine è rappresentato dall'albumina. L'albumina ha un peso molecolare di 60 kDa, e tutte le molecole più piccole dell'albumina riescono a passare, mentre tutto ciò che è superiore all'albumina viene trattenuto nel plasma.

Nella porzione renale esistono delle strutture chiamate tuboli renali attraverso i quali, per gradiente di concentrazione, tutte le molecole utili all'organismo vengono riassorbite e rientrano nel flusso ematico. Questo permette di trasformare l'ultrafiltrato del plasma nell'urina stessa, che non conterrà più sostanze utili all'organismo (perché riassorbite) e verranno perse solo ed esclusivamente elementi di scorie non utili all'organismo.

Quindi il nostro sistema è di differente permeabilità; ciò che viene ultrafiltrato poi viene riassorbito in modo tale che quello che viene effettivamente perso nelle urine è effettivamente ciò che l'organismo non richiede più utile fisiologicamente alla propria attività. In questo modo noi regoliamo due fenomeni: la pressione colloidale-osmotica e la pressione idrostatica.

La **pressione idrostatica** è una caratteristica fisica data dalla pressione del volume di sangue all'interno del nostro sangue. Quindi maggiore sarà la quantità di sangue all'interno del vaso, più il vaso sarà piccolo e maggiore sarà la pressione che ne consegue. Più il vaso sarà dilatato, minore sarà per unità di volume la pressione che abbiamo all'interno. Questo è un fenomeno prettamente emodinamico.

La **pressione colloidale-osmotica**, invece, dipende dalla concentrazione di soluti che abbiamo all'interno del liquido. Una soluzione viene definita ipotonica, isotonica o ipertonica in base alla concentrazione dei soluti che abbiamo all'interno. Più la condizione diventa di aumento di queste sostanze, più la pressione colloidale-osmotica sarà maggiore. A seconda che la pressione sia più alta all'interno o all'esterno del sistema renale avremo un gradiente colloidale-osmotico. All'interno del sistema vascolare la pressione, il gradiente, è maggiore e si avrà un riassorbimento; rimarranno all'interno del tubulo solamente la pre-urina e l'urina che poi verrà espulsa. Quindi è un bilanciamento tra pressioni colloidale-osmotiche intracellulari ed extracellulari.

Esiste anche la **pressione oncotica** che è quella delle molecole proteiche. Se perdiamo per aumento di pressione una quantità maggiore di proteine, avremo la proteinuria, ovvero una perdita fisiologica delle proteine in ambito renale. La proteinuria rappresenta un campanello d'allarme per la mancata funzionalità del rene.

BILANCIO IDRO-ELETTROLITICO

L'acqua è anche un'ottima fonte di integrazione di minerali fondamentali per il mantenimento dello stato di salute. I soluti contenuti nei liquidi dell'organismo possono essere:

- **Organici** (carboidrati, proteine, lipidi, metaboliti, cataboliti, ...)

Il metabolita viene utilizzato come substrato per le reazioni del nostro sistema organico, il catabolita è il prodotto della reazione che deve essere comunque disciolto all'interno del sangue. Il catabolita dovrà poi essere trasportato nell'emuntorio renale per essere perso qual'ora non riutilizzabile.
- **Inorganici** (mEq/l) dissociati: Cationi : Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} Anioni: Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , proteine, ...

Gli inorganici sono divisi in cationi ed anioni. Tra gli anioni sono inserite anche le proteine perché pur essendo delle molecole organiche, sono costituite da amminoacidi che possono avere in soluzione acquosa dei radicali neutri, carichi positivamente o carichi negativamente.

Esistono delle necessarie assunzioni giornaliere di questi elementi: se, ad esempio, non abbiamo abbastanza potassio non abbiamo la corretta contrazione muscolare e il corretto impulso nervoso in quanto il potassio è il carrier del calcio. La concentrazione di potassio all'interno del nostro organismo deve essere corretta, perché se non ho la differenza di potenziale che deve essere presente nella membrana, allora non potrò avere una depolarizzazione e una ripolarizzazione della membrana e quindi di conseguenza non si avrà una corretta contrazione muscolare o un corretto impulso nervoso.

I bicarbonati, invece, hanno un ruolo importante legato alla regolazione di pH perché si comportano da tamponi, ovvero possono legarsi sia agli acidi che alle basi. L'effetto tampone è molto importante per il nostro organismo, perché la funzionalità delle nostre cellule è tarata a pH 7.4. Se noi dovessimo avere condizioni di alterazioni del pH all'interno del nostro organismo potremmo avere delle conseguenze gravissime. Una semplice variazione di pH da 7.4 a 7.2, per esempio, può portare al coma diabetico. Il pH è regolato attraverso il sistema dei carbonati, fosfati e proteinati.

Tutte queste sostanze vengono normalmente secrete attraverso l'emuntorio renale.
- **Oligoelementi**: ferro, rame, cobalto, zinco, iodio, manganese (legati solitamente a proteine).

Gli oligoelementi sono di carattere inorganico presenti in bassa concentrazione, nonostante ciò sono vitali. Il ferro e il manganese sono utilizzati come cofattori per alcuni enzimi, altri ancora regolano la funzionalità di enzimi. Essi sono quasi sempre legati a molecole proteiche. Difficilmente si possono trovare liberi perché sono altamente reattivi. Sono quindi legati a molecole proteiche o attraverso un legame di vero e proprio binding, oppure di trasporto. La carenza di oligoelementi nella dieta è fonte di gravi problemi dello sviluppo (es. iodio → cretinismo, patologie tiroidee, ...)

PROFILO ELETTROLITICO

Con il profilo elettrolitico andiamo a vedere qual è la concentrazione di sodio, potassio, cloro e bicarbonato. Esso ci dà un'idea del bilanciamento intra ed extracellulare. Per fare il profilo elettrolitico teniamo conto di tutto ciò che è disciolto nel plasma. Il plasma ematico è un liquido prettamente extracellulare. Nel liquido extracellulare si ha un elevato contenuto di sodio, un basso contenuto di potassio e una quantità moderatamente elevata di cloro. Questo è tipico di tutti i liquidi extracellulari: siero, plasma, sudore, i liquidi gastroenterici ecc.

Se troviamo una condizione in cui non abbiamo questi valori di riferimento, allora sicuramente ci sarà stata una lisi di una componente cellulare.

Ogni volta che focalizziamo l'attenzione sui singoli componenti possiamo avere concentrazioni inferiori o superiori al range di normalità. Quando il sodio è ad un livello troppo basso di concentrazione allora si parla di **iponatremia**, in questo caso avviene una perdita di acqua e non si ha più un pH bilanciato. La perdita di acqua avviene perché non vi

sono abbastanza salati che possono richiamare l'acqua. Si parla invece di **iper-natriemia** quando il livello di sodio è troppo alto, in questo caso il sistema richiamerà l'acqua per bilanciare. Avremo così dei tessuti rigonfi di liquidi, si possono andare in contro a danni cardiaci e soprattutto renali.

Per descrivere le concentrazioni del potassio si utilizzano **iperkaliemia** se il livello è troppo alto e **ipokaliemia** se il livello è troppo basso. Se il potassio non è mantenuto a concentrazioni normali allora si potrebbero avere diversi problemi ad esempio: il cuore va in sofferenza.

I sali hanno un ruolo importante nella nostra alimentazione.

Quando parliamo di analisi delle urine, ci riferiamo a ciò che viene escreto dopo che il sistema ematico viene ultrafiltrato, riassorbito e poi perso attraverso l'emuntorio renale. Questo sistema è molto complesso perché passa attraverso quello che si chiama unità funzionale del rene ovvero il **NEFRONE** localizzato in una parte corticale e midollare del rene. Esso è composto da una parte *glomerulare* dove arriva la componente del vaso venoso. All'interno del glomerulo esiste una rete di capillari, questo significa che arriva la vena, si diffonde in capillari che sono estremamente fenestrati e quindi permettono uno scambio semplice con tutto ciò che c'è nel plasma per andare nello spazio extracellulare e quindi si ha un'ultrafiltrazione del plasma. Il plasma può passare tutto nell'ultrafiltrato. Tutto ciò che avviene nel glomerulo comporta versare tutto il liquido plasmatico in questa porzione.

Nella porzione *tubulare* del nefrone avviene il secondo meccanismo ovvero il riassorbimento del plasma. Quello che rimane all'interno dei *tubuli collettori* che raccolgono tutto l'ultrafiltrato non più utile all'organismo contiene la pre-urina e poi l'urina. Quindi diventa importante il bilanciamento di queste due funzioni. Ciò che viene riassorbito rientra nel circolo venoso. Tutti i prodotti catabolici che devono essere persi vengono disciolti in acqua e poi rilasciati con le urine.

Zona corticale → glomerulo

zona midollare → porzione tubulare

I tubuli collettori sfociano tutti nel calicetto renale che è la zona in cui parte l'uretere che porta l'urina dal rene alla vescica, in cui verrà accumulata e riassorbita l'acqua, e attraverso l'uretra avviene la minzione esterna. In questo caso quando si parla di cut-off si intende descrivere il livello che dice cosa può essere riassorbito oppure perso, questa selezione avviene grazie ad un valore standard ovvero 50-60KDa. Tutto quello che è al di sotto dei 50-60 viene perso, tutto ciò che è al di sopra del range viene trattenuto. Ciò significa che nelle urine, se il sistema funziona correttamente, non si trovano proteine. Se si trovano delle proteine in eccesso significa che le maglie non sono più in grado di filtrare. Il sistema può essere regolato dalla pressione del sangue, più è grande più sarà elevato il volume dell'ultrafiltrato.

Il rene ha un importante **funzione endocrina**, ha effetti sia intrarenali che sistemici ed agisce su tre settori:

- equilibrio emodinamico ed idrosalino
- metabolismo osseo
- eritropoiesi

Il sistema endocrino o omeostatico cerca sempre di ottenere la risposta più vicina alla fisiologia. Ad esempio esiste il **sistema renina-angiotensina** che è dato dalla renina che induce nel fegato la trasformazione di un angiotensinogeno in angiotensina, questo produce una vaso costrizione della catena renale con una diminuzione della tensione che passa attraverso il rene, quindi è un sistema di regolazione della pressione intrarenale per favorire la filtrazione e l'assorbimento renale.

L'omeostasi sta nel regolare a seconda del fabbisogno. Se ho un volume molto elevato di liquidi il rene deve filtrare di più si avrà una vaso dilatazione. In caso contrario si ha un piccolo volume di liquidi, si ha un aumento della vaso costrizione avendo così una minore ultrafiltrazione e quindi si produrrà una quantità minore di urina. Il sistema renina angiotensina controlla l'omeostasi. Un ormone importante per l'apparato renale è l'**eritropoietina** che fa parte di un sistema, questo è in grado di regolare la pressione parziale dell'ossigeno, ci sono dei punti recettoriali nel

rene in grado di captare il livello di ossigeno medio presente nel sangue venoso che va nell'ultrafiltrato. Se il livello è normale la quantità di ormoni viene regolata in maniera spontanea, se c'è un'ipotensione ovvero un abbassamento dell'ossigeno circolante nel sangue, il rene lo percepisce e produce eritropoietina che stimola il midollo a produrre globuli rossi che si legano all'ossigeno ripristinando il livello. Ci sono altre due componenti importanti: la **vitamina D** che è importante perché quando si ha un abbassamento della concentrazione del calcio, il rene lo rivela e il sistema recettoriale induce la sensazione del depauperamento di calcio nell'organismo stimolando un aumento della sintesi di vitamina D e la sua captazione permette all'ergocalciferolo della vitamina D3 di legare e di fissare il calcio nelle ossa. Un altro elemento ormonale sono le **prostaglandine** sono dei mediatori chimici responsabili della risposta infiammatoria. Tutto il nostro sangue viene sempre filtrato dal rene quindi in questo organo esiste un sistema di rilevazione elevato per le infezioni.

Ogni volta che ci si riferisce a dei parametri alterati delle urine si parla di **soglie**: queste sono dei livelli di concentrazione per cui il cut-off del rene di perdere o di riassorbire è regolato fisiologicamente. Esistono però delle condizioni sempre fisiologiche che non sono patologiche ma sono legate solo alla conformazione del rene, ad esempio una donna in gravidanza si trova in una condizione tale che porta ad un affaticamento renale, questo comporta che il rene allarga le proprie maglie. Bisogna sempre poter abbinare l'analisi dell'urina con le analisi del sangue. Esiste poi un sistema che ci permette di valutare la funzionalità renale controllando la velocità con il quale in sangue viene filtrato. Maggiore è la velocità, maggiore sarà la capacità di produrre urina. Ci sono delle sostanze che permettono di calcolare questo parametro **Velocità di Filtrazione Glomerulare** = *Quantità di sangue che viene completamente depurata nell'unità di tempo mediante la filtrazione (Clearance)*.

Un metodo fisiologico utilizzato per capire se il sistema renale funziona in modo corretto avviene attraverso la **creatinina**: è un indice della velocità di filtrazione del rene, viene espresso il ml/min. E a seconda di quanto riesco a trovare in volume per unità di tempo ho i parametri.

La concentrazione standard è data: dalla concentrazione della creatinina nelle urine per il volume delle urine nel tempo di osservazione / la concentrazione plasmatica media per il tempo di raccolta delle urine. Quello che viene standardizzato è un'ulteriore raffinata analisi della clearance della creatinina che permette anche di mettere in relazione la superficie corporea del paziente per una superficie corporea media diversa tra uomini e donne. A questo punto abbiamo dei livelli di riferimento che ci permettono di stabilire qual è la velocità di filtrazione glomerulare 15-90. Più la velocità è bassa più abbiamo un'incapacità del rene di filtrare. Inferiore a 15 è il caso di un'insufficienza renale con il bisogno di dialisi. Se invece aumentiamo la velocità di filtrazione >90 in questo caso la funzione renale è perfettamente normale. Quando si vuole controllare come funziona il rene allora si deve utilizzare il **gold standard** ovvero l'**inulina** ovvero un prodotto esogeno, che viene assunta prima delle analisi ed essa nel metabolismo non subisce modificazioni quindi tutto quello che verrà assunto in questo caso verrà anche filtrato ed eliminato ed è un parametro ottimale per capire la funzionalità.

L'esame delle urine è complesso e ci permette di vedere sia la funzionalità del rene sia tutti i componenti del sangue.

Raccolta 24h:

- raccolta dalle 8 alle 12h → appena ci si sveglia, accumulo delle urine nella vescica con la concentrazione di tutti i componenti
- raccolta della clearance nelle 24h → raccolta di ogni campione della minzione spontanea

BIOCHIMICA CLINICA LEZIONE 3

Quando parliamo dell'analisi delle urine prendiamo in esame fondamentalmente 3 fasi che sono legate alle caratteristiche intrinseche di questo liquido biologico e quindi:

1. Valutazione fisica
Colore
Trasparenza
Odore
Schiuma
2. Valutazione chimica
pH
Peso specifico
Proteine
Sangue
Nitriti
Esterasi leucocitaria
Ketoni
Bilirubina urobilinogeno
3. Esame del sedimento urinario
Emazie
Leucociti
Cellule epiteliali
Batteri
Altre cellule
Cilindri
Cristalli
Altri componenti

- Esame fisico o macroscopico
- Esame chimico-fisico
- Esame del sedimento urinario o microscopico

Con questi approcci totalmente diversi l'uno dall'altro da un liquido raccolto spontaneamente si può avere un'analisi dettagliata di tutti gli aspetti che possono essere legati sia alla componente biologica sia alla componente metabolica.

Quando facciamo una valutazione di tipo prettamente fisica si guardano le caratteristiche di: colore, trasparenza, odore e schiuma.

Si valutano queste caratteristiche perché siccome il liquido biologico deriva da un ultra-filtrato plasmatico tutto ciò che circola nel plasma e quindi nella componente liquida del sangue non coagulato si riversa e accumula nell'urina. Il colore delle urine dipende dal tipo di ultra-filtrazione di tutte le componenti che vengono assunte con dieta e l'alimentazione. Qualsiasi sostanza che contiene pigmenti può alterare il colore delle urine ma tra le sostanze fondamentale che modificano il colore delle urine troviamo urocromo, responsabile del colore giallo, urobilina e urocetrina. La prima deriva dal catabolismo dell'emoglobina, la seconda invece è la sua componente catabolica ulteriore e sono presenti in piccole quantità.

Il colore ci permette di avere un'analisi macroscopica poi da confermare dal punto di vista metabolico: ad esempio un eventuale lisi degli eritrociti può comportare un rilascio di emoglobina quindi una tendenza ad una colorazione molto più intensa ma che poi va comunque confermata attraverso dei test chimici.

La trasparenza dipende dalla presenza all'interno del liquido di soluti. L'eventuale torbidità può essere legata alla presenza di soluti o soprattutto alla presenza di forme di tipo batterico o micotico.

Questo già è di per se un indice che altera la visione e perciò l'analisi macroscopica è già indicativa di un'alterazione di tipo biologico.

L'odore ovviamente è legato alla stessa questione della componente del colore: tutto ciò che va ad incidere nell'alimentazione ne può cambiare i principali aspetti organolettici.

Un discorso a parte va fatto per la schiuma la cui condizione dipende da sostanze che sono disciolte all'interno delle urine e che presentano un effetto tensioattivo. La capacità tensioattiva è legata ad alcune sostanze di fare da separatore delle tensioni superficiali dei diversi liquidi e permette di comprendere quanto è presente in quel campione di sostanze che fungono da tensioattivi. Nell'organismo queste sostanze sono rappresentate da glucidi e proteine: maggiore è la schiuma nel campione maggiore sarà la quantità di queste due sostanze. Una schiuma bianca abbondante è sintomo di un'elevata presenza di proteine nelle urine e potrebbe essere sintomo di proteinuria. Una schiuma giallo-verdastra indica la presenza di pigmenti bilirubinici nelle urine.

Quando si va invece sulla specifica valutazione di tipo chimico di questo liquido biologico si vanno a osservare fondamentalmente questi parametri: pH, peso specifico, proteine, sangue, nitriti, esterasi di tipo leucocitario, chetoni e bilirubina (o urobilinogeno a seconda della versione che stiamo osservando nel kit).

Questi parametri sono importanti perché essendo questo un ultra-filtrato del plasma il pH ci dice quanto di questa struttura può essere ottenuta da una variazione fisiologica del pH plasmatico. Il pH del plasma è intorno ai 7.4 e fisiologicamente il sangue deve essere mantenuto molto rigidamente all'interno di questo pH ma l'ultra-filtrato che si ottiene nelle urine è privo di componenti proteiche e anche di molte di quelle componenti come i bicarbonati e i fosfati che sono responsabili del mantenimento del pH all'interno di certi valori. Questo comporta che se togliamo proteinati, bicarbonati, fosfati all'interno del liquido biologico quello che noi otteniamo è un liquido che non ha più gli effetti tampone e perciò ci allontaniamo dal pH a 7.4 e tendenzialmente ci abbasseremo ad un pH che fisiologicamente nelle urine è molto più acido rispetto a quello all'interno del plasma.

Altrettanto dicasi per il peso specifico perché molte delle sostanze che sono disciolte nel plasma (glucidi, proteine e quant'altro) comportano una valutazione anche di quello che è il parametro biologico peso specifico. Il plasma è molto più ricco di proteine e glucidi e ha un peso specifico più alto di quello normale. Nelle urine perdendo tutte queste componenti ci avviciniamo ad avere una densità più vicina ad 1 che alla densità del plasma. Proteine, sangue, nitriti, chetoni e componenti glucidiche devono essere assenti nelle urine in quando sono strutture che devono

essere riassorbite dal tubulo renale e perciò anche una minima presenza di una di queste componenti è abbastanza per definire la situazione anomala. E' ovvio che tutte queste sostanze devono essere assenti dalle urine per una motivazione biologica perché trovare del sangue, ad esempio, significa sicuramente avere un'emolisi (che in seguito bisogna capire se è di natura renale, ureterale, vescicale, uretrale) e perciò deve essere assente così come la forma leucocitaria.

Per quanto riguarda i chetoni e la bilirubina invece: i chetoni sono una trasformazione metabolica dei lipidi e vengono prodotti ogni volta che si ha la β -ossidazione. In condizioni normali vengono riassorbiti (sono caratteristicamente assenti nelle urine) per cui un ritrovamento di residui di corpi chetonici o di chetoni nelle urine è indice di un'alterazione del metabolismo lipidico nel sangue. La bilirubina invece è un marcatore della funzionalità epatica infatti viene prodotta durante la degradazione dell'emoglobina eritrocitaria. Un eccesso di degradazione di quest'ultima può portare ad avere un accumulo di bilirubina nelle urine. In generale, chetoni e bilirubina sono due marker urinari che indirizzano subito verso un alterato metabolismo di tipo plasmatico.

Per l'esame microscopico del sedimento urinario basta prelevare un campione di urina e sottoporlo a centrifugazione e poi andare ad analizzare ciò che si deposita sul fondo della provetta al microscopio ottico attraverso l'uso di un semplice colorante (vitale per le cellule) che mette in evidenza le componenti cellulari dalla componente inorganica e quindi permette di evidenziare la presenza di tutta una serie di componenti. All'interno del sedimento farà da padrona la componente dei cristalli (ovvero tutti quelli che sono soluti inorganici o organici aggregati) al cui interno si potranno distinguere tutte le componenti cellulari come funghi (si riscontrano spesso in soggetti immunodepressi, diabetici o sottoposti a terapia antibiotica. Il più comune è la Candida) e batteri (la cui presenza associata a leucociti può indicare un'infezione delle alte o basse vie urinarie) e tutte le componenti cellulari tipiche che fondamentalmente possono essere distinte in:

- **cellule epiteliali di sfaldamento** di tutto il tratto dell'apparato renale, di cui bisogna tenere in considerazione soprattutto il numero di cellule trovate, perché trovare le cellule rientra in una situazione fisiologica ma un elevato numero può essere sintomo di un'anomalia della condizione di sfaldamento
- **emazie**, che in condizioni fisiologiche non andrebbero trovate e che possono essere indice di una qualsiasi micro o macro lesione a carico dell'intero asse anatomico-funzionale dell'apparato renale. Una lesione può determinare un rilascio ed un accumulo di queste componenti che possono rimanere intatte se il pH ne consente la conservazione (le ritroviamo come emazie vere e proprie) oppure lisate, che prendono il nome di ghost (fantasmi cellulari) costituita dalla sola membrana.
- **Leucociti**, la cui presenza nelle urine, se superano il valore di riferimento, è un indice aspecifico di infezione alle vie urinarie e renali.
- **Cilindri**, che sono agglomerati di proteine o cellule che si formano nei tubuli renali. Normalmente non presenti, la loro presenza indica una sofferenza renale. La loro composizione è indice di diverse disfunzioni renali.

N.B.: Quando sono presenti batteri o funghi, associati a leucociti, l'esame verrà integrato da urinocoltura.

Tutti i parametri tenuti in considerazione durante queste analisi possono essere indicatori di patologie: ogni alterazione della funzionalità renale provoca un allargamento delle bande che filtrano il plasma e che causa il passaggio di sostanze che altrimenti non passerebbero e non ritroveremmo nelle urine. Nel caso di un'alterazione fisiologica (come una gravidanza, un allattamento prolungato o una posizione lavorativa per tante ore in piedi) basta il riposo per far sì che i valori tornino nella norma, altrimenti si parla di alterazione patologica.

Il pH è indice di un alterazione dell'equilibrio acido base: L'escursione del pH da un pH 4/ 6 decisamente acido ad un pH 8 decisamente alcalino e la variabilità dipende da quello che si riversa e si accumula nelle urine stesse. Esiste tutta una serie di sostanze che modificano il pH delle urine (ad esempio l'acido lattico, l'acido urico, l'acido piruvico, i corpi chetonici e fosfati monobasici) e una serie di situazioni come il digiuno, la dieta o l'esercizio fisico.

I test chimici invece prendono in considerazione la presenza e la quantità di sostanze all'interno dell'urina che in condizioni normali non si trovano e possono essere indici di particolari patologie. L'esame delle urine è perciò un esame molto utile sia dal punto di vista clinico che dal punto di vista diagnostico.

L'esame del volume delle urine è utile se si parla di urina raccolta nelle 24h. Ci permette di sapere il volume totale e cosa l'individuo nell'arco di quelle 24h ha fisiologicamente o in condizioni extra-fisiologiche riversato.

E' ovvio che tra neonati, adulti e anziani la differenza tra i volumi totali nelle 24h è notevole. Il volume delle urine totali dipende dalla necessità di trattenere e riassorbire le sostanze: in un neonato il volume totale può essere 1/10 o 1/20 inferiore rispetto ad un adulto perché necessita di trattenere le componenti indispensabili per la propria crescita.

Raramente si può riscontrare la presenza di strutture proteiche, lipidiche, glucidiche e quant'altro nelle urine di un neonato che tende a ultra-filtrare e riassorbire quasi tutto. Ogni volta che il neonato avrà episodi febbrili, l'effetto di perdita urinaria è molto più pronunciato e il bambino tende ad essere facilmente disidratabile. Il grado di disidratazione può portare all'espulsione fino a 500ml di liquidi (10 volte il normale) che mette a rischio la sopravvivenza del neonato.

Si parla di anuria quando c'è una mancata emissione di urine da parte dell'apparato urinario (per convenzione, si parla di anuria quando la produzione di urine è inferiore a 100 mL al giorno), oliguria quando c'è una riduzione quantitativa di emissione di urine e poliuria, invece, quando c'è un'iperproduzione e ipersecrezione di urine.

L'aspetto di un campione viene valutato attraverso uno strumento che prende il nome di nefelometro e permette attraverso una serie di lenti, tra cui è presente il liquido, di attraversare e leggere la stessa quantità di luce che viene emessa. Se qualcosa crea una barriera il lettore che sta dall'altra parte riceverà una minore intensità di luce e attraverso la legge di Lambert-Beer ci permette di sapere se il campione è perfettamente limpido o il grado di torbidità.

Una volta si utilizzava il test di Schweizer (figura 24.5)

Uso clinico dell'esame delle urine

Indicatori di stato di rene e vie urinarie	
Aspetto	Colore
	Trasparenza
	Odore
	Schiuma
Peso specifico	
Test chimici	Proteine
	Sangue
	Nitriti
	Esterasi leucocitaria
Sedimento urinario	Cellule
	Cilindri
	Cristalli
Indicatori di malattia o disturbo metabolico	
pH	Equilibrio acido-basico
Aspetto	Pigmenti
	Concentrazione o diluizione
Peso specifico	
Test chimici	Glucosio e chetoni (diabete mellito)
	Bilirubina (ittero-epatopatie)
	Bilirubina e urobilinogeno (epatopatie-anemie emolitiche)
	Emoglobina (emolisi intravascolare)
	Mioglobina (rabbdomiolisi)
	Proteine a catena leggera (mieloma γ -globulinopatie)
	Porfobilinogeno (porfiria)

ASPETTO




Figura 24.5
Il test di Schweizer. Il test si esegue antepo-
nendo la provetta contenente il campione a un testo stampato.
A sinistra, un campione di urine perfettamente limpido
e di colore normale, che consente la lettura del testo; al
centro, un campione lievemente torbido, in cui le lettere
del testo appaiono sfocate; a destra, un campione ematuro
fortemente torbido, in cui le lettere del testo non
sono riconoscibili.

Limpido	Non sono presenti particelle visibili
Lievemente torbido (hazy)	Visibili alcune particelle; guardando un giornale attraverso il recipiente le lettere non sono oscurate o distorte
Mediamente torbido (cloudy)	Guardando un giornale attraverso il recipiente le lettere sono leggibili ma sfocate o distorte
Torbido	Guardando un giornale attraverso il recipiente le lettere non sono visibili

Tabella 24.9
Costituenti che causano intorbidamento delle urine

Generalmente normale	Possibilmente patologico
Fosfati urati amorfi	Urati amorfi
Cristalli normali	Cristalli anormali
Cellule epiteliali squamose o di transizione	Cellule epiteliali renali, di transizione, maligne
	Emazie
	Leucociti
	Cilindri
	Lipidi
Batteri (urine conservate)	Batteri (urine fresche)
	Microorganismi miceti, parassiti
Muco	
Sperma, fluido prostatico	Chiluria (linfa)
Polveri, antisettici	Materiale fecale

Quando parliamo di prodotti catabolici del sistema proteico parliamo di urea, azoto e quindi di proteinuria (proteine nelle urine). Noi sappiamo che le componenti proteiche di qualunque genere contengono oltre al gruppo R (gruppo che differenzia gli aminoacidi gli uni dagli altri) i due elementi periferici ovvero il gruppo amminico e il gruppo carbossilico. Il gruppo amminico, che contiene l'azoto, è quello che viene degradato, liberato e trasformato nel prodotto catabolico che prende il nome di urea. Ogni volta che assumiamo con l'alimentazione un eccesso di molecole proteiche noi produciamo due componenti: acido urico e urea. Entrambi possono accumularsi, se in eccesso rispetto al fabbisogno, sia nel plasma sia nelle urine. L'acido urico fisiologicamente viaggia all'interno del circolo sanguigno fino a raggiungere i reni dove verrà filtrato ed eliminato tramite le urine. In condizioni di eccesso tende a depositarsi nelle zone osteo-articolate (articolazioni) generando la patologia che prende il nome di gotta. I depositi di acido urico causano reazioni infiammatorie con dolenza articolare che impedisce i normali movimenti degli arti. L'eccesso di urea invece va nelle urine e la sua struttura può generare una trasformazione di alcuni componenti a favore dei batteri: più sono presenti batteri più l'urea viene trasformata in ammoniacale più il danno renale è conclamato (facilmente identificabile dall'odore ammoniacale del campione).

Ogni volta che parliamo di urea parliamo di riserva di azoto proteico all'interno dell'organismo perchè le componenti proteiche sono sia quelle che possono essere degradate facilmente sia quelle da cui si effettua la sintesi proteica. Quindi il bilancio dell'azoto nasce da un equilibrio: l'urea prodotta viene al 50 % persa e al 50% riassorbita nel sangue. Tutto ciò che noi osserviamo come urea dipende da tanti fattori:

- **l'idratazione:** maggiore quantità di volume riusciamo ad introdurre maggiore quantità sarà persa attraverso l'emuntorio renale, maggiore sarà l'urina che conterrà urea maggiore sarà la perdita spontanea di questo componente perché non è fisiologicamente così importante riutilizzarle ma non indispensabile.
- **assunzione proteica:** chi fa un uso/abuso di sostanze proteiche perde più facilmente urea formando urati (sali dell'urea) e quindi probabilmente calcoli di tipo urico.
- **riassorbimento gastrointestinale:** questo è uno dei motivi per cui l'urea prodotta non viene tutta espulsa. Nel sistema gastroenterico le cellule del colon e di altre porzioni dell'intestino portano l'urea attraverso la vena porta nel fegato dove viene rimetabolizzata per nuove molecole proteiche a seconda del fabbisogno.
- **malnutrizione (mancata assunzione) o il fenomeno del malassorbimento:** sistema secondo il quale pur introducendo le molecole c'è il mancato assorbimento delle stesse che vanno ad arricchire il sistema delle feci.

La proteinuria è causata da una filtrazione non abbastanza selettiva. All'interno del nefrone esiste un cut-off di 60kd che permette il passaggio solo a molecole più piccole di 60Kd mentre tutto ciò che ha un peso maggiore rimane nel plasma.

Tutto ciò che è maggiore di 60kd rimane nell'ultra filtrato che arriva al tubulo. Il tubulo a sua volta ha delle maglie che sono molto più strette del glomerulo (60Kd) dove si arriva fino a 5/6 Kd e quindi si riassorbono tutte le componenti proteiche e si perdono solo frammenti polipeptidici di bassissimo peso molecolare. Nel prodotto finale delle urine la quantità di proteine che fisiologicamente possiamo trovare deve essere irrisoria e si aggira ai 150 mg

nelle 24h cioè 10mg per ogni 100ml. Normalmente nel plasma sono presenti 80g/L di proteine perciò la quantità persa è veramente piccola. La proteinuria ha un'identificazione per antonomasia con l'albumina che fa da demarcazione in quanto ha un peso di 60kd: trovare l'albumina ci da un parametro che indica quanta ne è stata persa nelle urine. E' un errore ma viene identificata l'albuminuria come quella molecola proteica indicativa della perdita proteica.

Ogni volta che si parla della alterata capacità di perdere contenuto proteico nelle urine si parla di albuminuria che a seconda della quantità sarà assente, lieve, moderata o grave. Questo ci permette di essere in correlazione con il GFR: tanto più è elevata la capacità di filtrare maggiore sarà la quantità di urina che io ottengo, più basso è il GFR più bassa è la capacità del rene di lavorare. Un GFR inferiore a 15 il rene non funziona, superiore a 90 si ha un rene che funziona alla velocità adeguata di filtrazione. In questo confronto si ha tutta una serie di situazioni in cui riconosciamo una proteinuria, che può essere:

- **Transitoria o intermittente:** nel quale avviene una perdita proteica dovuta ad esempio a dello stress, stanchezza o uno sforzo lavorativo e che in seguito a del riposo torna ai valori normali
- **Funzionale o ortostatica:** nel quale avviene una perdita proteica dovuta ad una posizione del nostro corpo (passare troppo tempo in piedi o seduti).
- **Persistente:** in cui la perdita di proteine è legata ad una patologia renale o generale.

Oltre al tipo di proteinuria, si può classificare l'intensità con cui questa si manifesta in: minima, moderata e grave. Si parla di proteinuria minima quando i valori si aggirano intorno ai 1000mg/24h, moderata quando i valori si aggirano tra i 1000-4000 mg/24h e grave quando i valori superano i 4000mg/24h. In caso di proteinurie moderati o gravi si parla di nefropatie e/o tubulopatie. Questo comporta un depauperamento delle proteine plasmatiche e quindi il rene perde proteine, l'organismo rimane senza molecole proteiche e se non c'è una giusta assunzione o una giusta limitazione del danno renale si incorre in un danno metabolico molto importante.

Tutti i componenti metabolici delle urine hanno come caratteristica la desinenza -URIA:

La glicosuria è la quantità di glucosio nelle urine. Esiste una soglia renale al di sopra della quale il glucosio viene perso nelle urine, mentre ciò che è al di sotto della soglia viene riassorbito. La soglia renale è rappresentata da una concentrazione che in un soggetto normale è pari a 160 mg/dl.

Stessa cosa per tutte le componenti: superata una certa soglia tutto ciò che è in eccesso lo ritroviamo nelle urine. Quando abbiamo la presenza nelle urine di emoglobina o mioglobina, due elementi che provengono rispettivamente dall'eritrocita e dal muscolo scheletrico, le urine che assumeranno una caratteristica colorazione rossa che varia di intensità in relazione alla concentrazione. Ci sono diversi tipi di motivazioni del perché possiamo trovare emoglobina o mioglobina nel sangue che vanno dalla pseudopatologia alla patologia conclamata. Un'emoglobinuria può avere cause infettive parassitarie (es. l'agente eziologico della malaria), cause immunitarie (es. porpora trombocitopenica), cause meccaniche (esercizio strenuo) o può essere causa di enzimopatie (carezza G6PD che causa il favismo). Una mioglobinuria invece può avere cause meccaniche (stress, sport violenti), cause vascolari (ischemia), cause infettive (Influenza, EBV), può essere causata da malattie ereditarie o dall'assunzioni di farmaci e sostanze tossiche.

N.B.: la MIOGLOBINURIA è un marker di tutte le patologie muscolari e aiuta a capire dove è avvenuto l'infarto perché il muscolo scheletrico si comporta in maniera differente dal muscolo cardiaco.

Esistono poi altri parametri come la bilirubina, i nitriti e le esterasi leucocitarie.

La bilirubina deriva dal catabolismo epatico e a seconda della quantità di bilirubina possiamo risalire al tipo di danno: se ad esempio la bilirubina è sia nel sangue sia nelle urine il danno è epatico, se la bilirubina è presente solo nel sangue si parla di ittero.

BILIRUBINA E UROBILINOGENO

Tabella 24.18

Rilievi di laboratorio nei diversi tipi di ittero e loro diagnosi differenziale

Ittero	Bilirubina sangue	Bilirubina urine	Urobilinogeno urine	Feci
Emolitico	+++	Neg	+++	Marrone scuro
Epatocellulare	++	++	N/+	Normali o chiare
Ostruttivo	N/+	+++	Assente	Acoliche

NITRITI

Obiettivo e rationale del test	Evidenziare le infezioni del tratto urinario attraverso la capacità di alcuni microrganismi (gram negativi, enterobacteriacee) di trasformare i nitrati in nitriti
Sensibilità	0,05-0,1 mg/dL
Falsi positivi	Farmaci azocomposti e coloranti diversi
Falsi negativi	Batteri incapaci di ridurre i nitrati
	Pollachiuria (persistenza delle urine in vescica <4 h)
	Ridotto apporto dietetico di nitrati
	Presenza di sostanze fortemente riducenti

I nitriti sono le alterazioni dei prodotti dell'azoto che vengono accumulati nelle urine come sotto prodotti catabolici dell'azoto. La loro presenza nelle urine è legata solo alla presenza di farmaci o batteri. I nitriti non possono essere presenti se non in presenza di sostanze riducenti.

ESTERASI LEUCOCITARIA

Obiettivo e rationale del test	Evidenziare le infezioni del tratto urinario con una valutazione indiretta del numero di granulociti (soprattutto neutrofili) ottenuta dosando la leucocito-esterasi, presente nelle granulazioni delle cellule
Sensibilità	5-15 leucociti x HPF
Falsi positivi	Contaminazione con ossidanti (ipoclorito etc.) o formalina
	Nitrofurantoina
Falsi negativi	Glicosuria >3 g/dL
	Albuminuria >500 mg/dL
	Farmaci: cefalexina, cefalotina, tetraciclina, gentamicina

Quando parliamo di esterasi leucocitaria parliamo di leucociti presenti nell'apparato renale. Si noti che si parla di esterasi leucocitaria e non di leucociti, cioè si presume che non ci sia una presenza di forme cellulari integre ma siano lisate con il conseguente rilascio dell'esterasi. L'esterasi ha la funzione di degradare le proteine che fanno da supporto alla matrice connettivale. Risultare positivi per l'esterasi leucocitaria correla con la presenza di leucociti nei fluidi corporei. Inoltre l'associazione del test per l'esterasi leucocitaria con il test dei nitriti urinari fornisce uno screening eccellente per identificare la presenza di una infezione delle vie urinarie (IVU).

LEZIONE 4

DIAGNOSTICA EMATOLOGICA E COAGULAZIONE

EMATOPOIESI

L'ematopoiesi è il processo che da origine a tutte le cellule del sangue a partire da **cellule staminali ematopoietiche o emcitoblasti**.

Nei processi che portano alla maturazione delle cellule staminali l'infiammazione gioca un ruolo molto importante insieme ad altri processi come i CFS (colony stimulating factor) e i TPO.

I CFS sono siglati per comprendere una famiglia molto complessa di molecole, di cui ne conosciamo solamente alcune. Questi fattori sono importanti perché ad ogni step di maturazione delle cellule staminali hanno un ruolo ben preciso. L'esempio più classico riportato è quello dell'eritropoietina che è l'unica sostanza indispensabile per eseguire un cambio da una cellula staminale midollare verso la via eritroide.

Questo ci suggerisce che esistono dunque delle componenti che messe a contatto con le cellule staminali inducono, nelle staminali stesse, una deviazione da quello che è il profilo evolutivo verso una linea di differenziamento.

Lo stesso discorso vale per la TPO o trombopoietina, una sostanza che induce una trasformazione delle piastrine. Il microambiente e tutto ciò che può essere al suo interno o aggiunto o modificato o, per qualsivoglia motivo fisiopatologico, essere presente in quel contesto, può deviare, se proveniente dall'esterno, o guidare, se cambiato da noi, una guida di trasformazione staminale.

Se osserviamo quali sono e dove avvengono queste trasformazioni ci accorgiamo che l'emopoiesi è divisa in diversi settori: **una parte midollare, una parte ematica** ed invece **una tipica dei tessuti**. Questo significa che l'emopoiesi non è solamente propria del midollo, ma durante le prime fasi iniziali (quelle prettamente limitate alla trasformazione di una cellula staminale ad una pluripotente che deve ancora differenziarsi) avviene esclusivamente nel midollo, dopodiché questa andrà nel sangue come cellula matura per poter svolgere la funzione, con un ciclo vitale a seconda delle linee cellulari. Ogni linea cellulare ha un timing ovvero un tempo di maturazione (es: l'eritrocita dura 120 giorni, mentre il linfocita 7 giorni), quindi questa parte vitale avviene nel sangue.

Gli stimoli che permettono il passaggio dal midollo al sangue non sono ancora ben noti, il fenomeno prende il nome di homing: quando una cellula staminale si è differenziata, ma non è arrivata a perfetta maturazione, riceve degli impulsi per cui la maturazione completa della cellula avviene durante l'extra-vasazione dal midollo per entrare nel sangue.

Tutte le cellule che conosciamo nel sangue sono mature che hanno un loro ciclo vitale ben determinato, ma che non è necessariamente limitato al sangue, alcuni di questi componenti devono migrare (homing) e, cercare dunque, la localizzazione nel tessuto finale in cui devono svolgere la loro attività. Un esempio è la componente linfoide che deve andare solamente nei componenti linfatici, nei quali svolgeranno la loro funzione. Quando escono dal tessuto linfatico, questi presentano una funzionalità fisiopatologica. Un altro esempio, invece, sono le componenti mieloidi che devono andare in alcune forme di tessuto, nei quali sono ubiquitarie, in quanto svolgono la funzione di risposta immunitaria cellulo-mediata (cellule dendritiche, mastociti e macrofagi).

Quando parliamo di emopoiesi è alquanto riduttivo parlare del midollo, in quanto solo una parte avviene in quest'ultimo, la maturazione crea homing per andare nel sangue e dove avviene un'ulteriore maturazione e il roaming nei vari tessuti a seconda dei componenti. Ogni cellula staminale che sta nel midollo crea quelli che, più comunemente, sono chiamati "genitori", ovvero genera delle componenti cellulari che hanno due tipi di differenziamenti a monte, una verso la linea linfoide, l'altro verso la linea mieloide. A partire dal **progenitore linfoide**, invece, vedremo che a seconda delle CFU (cellule formanti colonie ovvero fattori che stimolano la produzione di colonie verso la loro fase di differenziamento), otterremo una colonia di cellule linfoidi che genereranno, solo dopo maturazione ed extra-vasazione nel sangue, i linfociti T, B, NK. Questi sono importanti in quanto, la linea linfoide, può generare esclusivamente queste 3 forme cellulari che matureranno nel sistema sanguigno, che dovranno poi andare nei diversi tessuti linfatici nei quali svolgeranno un diverso tipo di funzione a seconda della loro caratteristica intrinseca.

- LINFOCITA T: genererà la risposta del timo.
- LINFOCITA B: attraverso la produzione di plasmacellule, produrrà anticorpi.
- LINFOCITA NK: è il sistema di difesa contro le componenti estranee. (NK acronimo che sta per: natural killer).

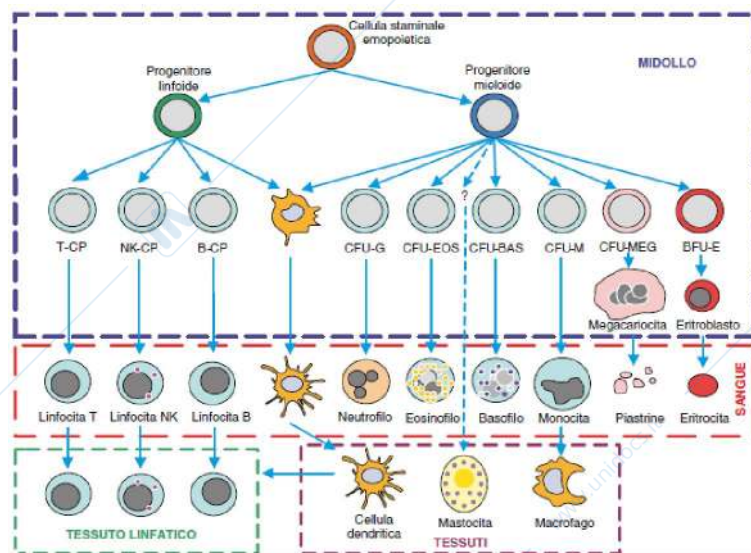
Questo sistema non può essere sempre e solo circolante, in quanto avremo delle risposte esclusivamente da una risposta midollare, il che non sarebbe conveniente per l'organismo, in quanto quando veniamo a contatto con un agente eziologico esterno la nostra risposta immunitaria deve essere pronta per fare una barriera immediata. Esistono quindi gli organi periferici come ad esempio il timo, che permettono di avere una risposta subitanea a quella che è l'introduzione ad un agente eziologico esterno. Gli organi linfoidi, hanno dunque, una ragion d'essere, in quanto ci danno migliore risposta in caso di attacco di agenti eziologici.

Analizzando invece la **linea mieloide**, vedremo che il differenziamento generato da un progenitore mieloide è molto più complesso. A seconda dei diversi tipi di CFU noi osserveremo tutta la componente che circola come componenti polimorfonucleate, cellule caratterizzate da nucleo polilobato a forma multipla (neutrofili, eosinofili e basofili). La distinzione è dovuta ad una diversa granulazione citoplasmatica ed a seconda del tipo di reattività con coloranti tipici del sangue, avranno dunque una colorazione rispettivamente: neutra, acidofila e basofila. La differente colorazione

deriva dai differenti granuli di secrezione presenti all'interno, i quali contengono molecole proteiche che danno risposte diverse a seconda della reazione. Esiste un'altra colonia che porterà alla formazione del monocita, che successivamente, dietro stimolo nei tessuti, porterà alla formazione del macrofago. Ricordiamo come ad esempio il macrofago, se a contatto con un soggetto che presenta un'ipercolesterolemia, quindi un elevato livello di lipidi nell'organismo, tende ad inglobarli nella propria forma macrofagica divenendo dunque una cellula schiumosa e predisponendo il soggetto verso una patologia aterosclerotica quando ci sono altre concomitanze di fenomeni infiammatori.

Esistono altre due linee sempre del progenitore di tipo mieloide, che sono la linea megacariocitica e quella eritroide. I megacariociti restano nel midollo come cellula matura molto complessa e grande, la quale si frammenterà in tutte le porzioni nucleari che permetteranno di riconoscere le piastrine. Le piastrine sono dunque frammenti di megacariocita, non è elementi cellulari e non ha una vita autonoma.

L'eritrocita che viene a formarsi da progenitore di tipo mieloide avrà una maturazione da una cellula, che in presenza di eritropoietina si trasforma in tutte le varie fasi fino ad arrivare al reticolocita che sarà presente ancora nel midollo (si differenzia dall'eritrocita perché presenta il nucleo al suo interno). Una volta perso il nucleo per un fenomeno apoptotico controllato, l'eritrocita diventa maturo pronto per circolare nel sangue, prenderà dunque la via ematica come eritrocita maturo, non presentando il nucleo durerà 120 giorni, successivamente prenderà la via della milza e verrà trasformato/ridotto nelle varie componenti (emoglobina, componente plasmatica) per poi ritornare al midollo per poi riprodurre nuovi eritrociti, questo ciclo vitale durerà, ovviamente, 120 giorni.



Alcune di queste componenti si localizzano nei tessuti come ad esempio il macrofago, cellula dendritica o del mastocita, che hanno funzionalità esclusivamente per la risposta cellulo-mediata per tutti gli agenti eziologici (questi sono la prima barriera per tutte le infezioni a cui possiamo andare incontro). Esistono poi alcune forme cellulari che sono intermedie tra quelli che sono i due progenitori che daranno esclusivamente origine alle cellule dendritiche. Le cellule dendritiche sono cellule molto particolari che serve per migliorare la risposta immunologica, sono quelle che vanno incontro al fenomeno di identificazione, ovvero sono quelle cellule che presentano sulla superficie l'antigene estraneo (componente esogena) su questa la cellula dendritica si associa, portando alla trasformazione dei linfociti B in plasmacellula portando alla produzione dell'anticorpo sullo stampo dell'antigene specifico.

La nostra risposta non è policlonale bensì monoclonale, ovvero l'anticorpo sarà così specifico che rimarrà per tutta la vita formando risposte solamente nei confronti di quell'agente eziologico. Se per errore avremo una qualità di risposta policlonale possiamo andare incontro a fenomeni di patologie immunitarie (**malattie autoimmuni**).

Tutto questo complesso meccanismo di risposta e quindi di elaborazione emopoietica è in realtà tempo dipendente, quindi esiste la vita intrauterina, fetale, post natale e poi quella adulta fino all'età senile, dove avremo risposte diverse e caratteristiche di emopoiesi diverse. Durante la vita embrionale (primi 3 mesi di vita intrauterina) il nostro sistema non è maturo e tutto ciò che avviene in quella fase avviene grazie alla protezione materna: l'unico sistema di

difesa è la barriera feto-placentale che deriva dal sistema anticorpale della madre. Questa barriera è di fondamentale importanza in quanto, pur essendo geneticamente diversa, non viene riconosciuto come estranea e quindi non avremo una risposta esagerata nella produzione di anticorpi, ma viene ad essere riconosciuto come self, e si entra dunque nel concetto di tolleranza immunologica. Passato il periodo embrionale avremo dunque vita fetale-intrauterina, a partire dal terzo mese in poi, il sistema fetale aumenta di volume e acquisisce funzionalità ma sarà già tutto formato, quindi il sistema organico del midollo e di tutti gli organi tissutali e periferici sono pronti e maturi però presentano una risposta diversa di quella dell'adulto in quanto il neonato dovrà acquisire una memoria immunologica, dovrà far crescere il proprio sistema per differenziare le proprie forme cellulari. Le sedi dell'emopoiesi saranno differenti da quelli post natali. Ad esempio nei primi 6/7 mesi è la milza produttrice di sostanze ematopoietiche, nell'adulto invece la milza sarà l'organo emocataretico. Ovviamente più si ci avvicina alla nascita del bambino, più si ha il passaggio da fegato e milza verso il midollo osseo, che resterà per tutta la vita anche nella fase post natale. Ogni volta che nella fase adulta localizziamo dove avremo l'emopoiesi troveremo un differenziamento dalla fase neo-natale, il midollo osseo è presente in tutte le ossa, in quanto sono in fase di sviluppo, mentre nella fase adulta non sono tutte le ossa a produrre midollo, solamente alcune saranno ematopoietiche per la presenza di zone di nicchie staminali (costole, sterno, osso sacro e nelle estremità prossimali come ad esempio quella del femore) zone nelle quali si effettua un prelievo midollare. Queste diverse condizioni di localizzazione dipendono da quanto dovrà essere intensa una produzione ematopoietica, mentre in una fase adulta una componente sternale o midollare è più che sufficiente per far fronte ad un intero organismo.

Tutta l'emopoiesi contribuisce alla formazione di alcune diverse forme cellulari nel sangue circolante, queste forme cellulari si accomunano all'interno del liquido che circolano nei nostri vasi sanguigni (vene, arterie) e sono soggetti ad una diversa composizione dovute ad età, differenze sessuali, stili di vita.

Le funzioni del sangue più importanti sono:

- Trasporto di gas respiratori;
- Trasporto di nutrienti assorbiti dall'intestino verso il fegato ed ai tessuti
- Trasporto dei cataboliti agli organi emuntori
- Trasporti degli ormoni dalla sede di sintesi agli organi bersaglio
- Regola la distribuzione del calore nell'organismo
- Regola il pH e la composizione dei liquidi interstiziali
- Protezione contro tossine e patogeni (Ab, GB, enzimi...)

Il trasporto di gas respiratori avviene grazie agli eritrociti, al cui interno è presente una molecola, l'**emoglobina**, che presenta la capacità di legare in maniera molto forte la componente dell'ossigeno e dell'anidride carbonica presente nei diversi tessuti o gas respiratori polmonari. Grazie a questa capacità facilita il ripristino della componente di ossigeno nei diversi tessuti attraverso lo scambio di molecole gassose: avviene la captazione dell'anidride carbonica per poter essere trasportata dal circolo venoso nei nostri polmoni dove viene ceduta con uno scambio gassoso di differente capacità all'interno dei polmoni (espulsione dell'aria ricca di anidride carbonica per via di una molecola di ossigeno, mantenendo invariato il circolo). Il sangue è di fondamentale importanza anche per il trasporto di cataboliti, principalmente ai reni, ormoni che ricoprono distanze più o meno ampie in base alle sedi destinate, generando risposte specifiche nelle cellule/tessuti bersaglio. E' inoltre importante per la regolazione della temperatura corporea, attraverso una vasodilatazione avremo un afflusso maggiore di sangue nella zona periferica, un ulteriore aumento, provoca la secrezione di sudore da parte delle ghiandole sebacee. L'importanza del sudore è quella di favorire l'evaporizzazione e quindi un successivo raffreddamento del sistema stesso, il sangue è dunque in grado di entrare nella fase di termoregolazione corporea. Regola il pH e la composizione dei lipidi interstiziali (PH fisiologico 7,4), variazioni di pH portano serissimi problemi come ad esempio un coma diabetico (PH 7,2), è per questo che nel sangue avremo delle sostanze tampone al proprio interno come proteine, fosfati, bicarbonati, che contribuiscono a mantenere il range di pH intorno ai 7,4. La presenza di queste sostanze tamponanti è dovuto alle innumerevoli altre sostanze presenti all'interno del sangue. Questo rigido sistema di sostanze presenti nel sangue

permette dunque di mantenere un pH ottimale, altrimenti avremo degli sbalzi di pH che provocherebbero processi di alcalosi e acidosi molto complessi e gravi per l'organismo.

La risposta enzimatica nel sangue è di fondamentale importanza, in quanto permette ai diversi tipi di cellule che sono coinvolte nella risposta immunologica di agenti estranei e di avere una risposta mirata. Tutti gli enzimi dei neutrofili e macrofagi sono sostanze solubili per creare una barriera di difesa nei confronti di agenti esterni. In questo caso si fa riferimento agli anticorpi e dei globuli bianchi, in cui le granulazioni intra-cellulari giocano un ruolo molto importanti in questi enzimi che possono avere un effetto tampone.

Quando si effettuano dei prelievi di sangue, a seconda dell'anticoagulante posso ottenere delle risposte diverse rispetto al sangue non coagulato. Prelevare del sangue in presenza di citrato o di EDTA genera una diversa composizione di quelle che le componenti cellulari stesse. Sappiamo ad esempio che l'EDTA è un chelante del calcio quindi l'effetto maggiore sarà quello di inibire tutti i fenomeni coagulativi. Se ad esempio ci interessa maggiormente il numero delle forme cellulari presenti (informazione quantitativa) dovrò avere delle condizioni che mi permettono di mantenere le varie forme cellulari per lo più inalterate, per questo useremo il sodio-citrato (stabilizzante dei granuli cellulari). Quando eseguiamo un esame emocromo-citometrico eseguiamo un'analisi legata alla componente sia solubile sia legata alle cellule all'interno del nostro sangue, analisi sia qualitativa sia quantitativa, quindi eseguiamo una conta, un dimensionamento e una determinazione di alcuni metaboliti all'interno di queste forme cellulari. Grazie a questi tipi di analisi possiamo costruire l'indice eritrocitario e la formula leucocitaria (elenco in % della composizione delle cellule bianche all'interno del sangue), l'indice eritrocitario ci dice il numero di eritrociti, il contenuto di emoglobina all'interno ed il livello di maturazione. La combinazione di queste due formule compone, dunque, l'intero **esame emocromo-citometrico**.

Il sangue analizzabile è sia capillare sia venoso: la tecnica capillare è usata per lo più in prelievi in età neonatale in modo tale da evitare ematomi; il sangue di tipo venoso è più semplice in età adulta, e questo ci permette di poter eseguire una migliore analisi in quanto evitiamo il danno meccanico del capillare, più il vaso è piccolo, più induciamo un danno meccanico.

Il volume corpuscolare medio ci dice quanto il globulo rosso ha al proprio interno un particolare volume intracellulare: si possono avere dei microciti (molto piccoli) o macrociti (molto grandi), quindi il contenuto interno ci dice se lo standard di grandezza è inferiore o superiore a quello di un eritrocita normale. Ci dice anche quale sarà la concentrazione corpuscolare media e questo diventa importante perché ci dice il contenuto medio dell'emoglobina, e ci permette dunque di capire il contenuto totale di emoglobina all'interno dei nostri eritrociti e se dunque corriamo ad esempio un rischio anemico o un'eventuale iper-produzione. Ci possono essere dei casi, fisiologicamente, in cui i globuli rossi, ancora non maturo, possono andare nel sangue periferico, questo ci fa capire subito la presenza di un globulo rosso con forma alterata o la presenza di frammenti nucleari (anisocitosi). Se all'interno di questi esiste anche una discromia (ovvero un contenuto alterato dell'emoglobina) noi avremo l'indice di anisocromia, ovvero globuli rossi con contenuti emoglobinici diversi. Queste sono delle formule che ci evidenziano dei presumibili danni midollari piuttosto che periferici (l'attenzione si sposta sull'emopoiesi). Il conteggio dei bianchi e il conteggio delle piastrine è molto importante, perché le piastrine ci danno le indicazioni su un fabbisogno di un'alterata capacità coagulativa del soggetto, mentre invece i globuli bianchi ci danno un'indicazione sull'assetto della risposta cellulomediata o immunologica in senso lato.

Quando noi parliamo di globuli rossi con contenuto diverso di emoglobina possiamo avere diverse cromie e citosi:

- **normocromia, ipocromia ed ipercromia** → dipendono dal contenuto di emoglobina e dunque dall'intensità del colore data dell'emoglobina stessa
- **normocitosi, microcitosi e macrocitosi** → dipendono dalle dimensioni del globulo rosso

Si parlerà di normocitosi quando i globuli rossi si presentano sotto la classica forma biconcava, microcitico se più piccolo, macrocitico se più grande. Le microcitosi sono sempre associate a forme benigne di anemie perché il globulo rosso più piccolo anche se presente in giuste percentuali genera, rispetto ad un globulo rosso con dimensione normale, una minor capacità di trasporto dell'ossigeno essendo una cellula molto più piccola del normale. Le anemie

microcitiche sono ad esempio l'**anemia mediterranea** (zone soggette sono ad esempio: Sicilia, Sardegna).Altra condizione importante da tenere presente sono le escursioni fisiologiche che si possono avere in soggetti che abitano in zone diverse, ad esempio le persone che abitano pressochè in zone marittime non subiscono variazioni dovute all'altitudine, ma se noi prendiamo un soggetto e lo portiamo a 2000 metri, il livello delle piastrine potrebbe essere differente (bisogna tenere presente quindi inoltre dei luoghi e degli stili di vita dei pazienti. Ad esempio chi fa molta attività sportiva avrà un livello di ematocrito e di piastrine maggiore).

Il modo per vedere le caratteristiche di eventuali diverse forme cellulari presenti più comune è un'analisi microscopica: attraverso fenomeni di colorazione specifica possiamo così vedere e valutare delle forme diverse presenti all'interno dei campioni che analizziamo. Per poterlo fare si quello che si chiama "**striscio di sangue**" ovvero una porzione di sangue non coagulato che in presenza di sodio-citrato e adenosina-citrato (che mantengono la cellula nella forma più integra senza danni meccanici), si posiziona la goccia di sangue in un lato del vetrino, e si striscia nella direzione opposta alla goccia (altrimenti faremo un danno meccanico). Questo permette di creare un sottile film (strato) di sangue non coagulabile sulla superficie del vetrino stesso, dopodiché lo si può fissare al calore o all'aria e questo è più che sufficiente per creare uno strato asciutto dopo l'evaporazione della componente. Dopo l'avvenuta deposizione sul vetrino si dovrà effettuare la colorazione, quella più classica è quella del May-Grünwald che è una colorazione mista che serve sia per la componente cellulare sia per quella citoplasmatica e questo diventa utile per poter differenziare il nucleo, ovviamente tramite tintorialità diverse da quella che è la colorazione del citoplasma. Servono entrambe perché il citoplasma ci permette di vedere le componenti che sono granulate e tutti i polimorfo-nucleati a seconda dei granuli presenti ma anche le forme nucleari, così da poterli distinguere. Il risultato è quello di avere la tintorialità nel blu a seconda dell'intensità nel nucleo, le diverse colorazioni citoplasmatiche a seconda del grado di acidità, basofilia, neutralità presenti all'interno, oppure del policromatofilo (quello che assume più tintorialità diverse all'interno).

Esistono varie forme di globuli rossi e possono provocare delle patologie differenti, un esempio sarà l'**anemia falciforme** (detta anche trepanocitosi) che nasce da un'alterazione genetica dell'emoglobina che trasforma un aminoacido cambiando la propria costituzione aminoacidica, che non legherà più con la stessa efficienza l'ossigeno e così facendo fa assumere al globulo rosso la forma a falce da cui prende il nome. Queste variazioni di forme possono creare delle conseguenze emodinamiche piuttosto gravi, basti pensare ad un globulo rosso che non è più un disco biconcavo, e quindi sprovvisto della propria capacità di diapedesi, può in alcuni punti dell'organismo creare degli ingorghi emodinamici e creare quindi delle condizioni, come, ad esempio quella dell'infarto renale in questi soggetti (perché i globuli rossi con anemia falciforme si addossano e creano dei precipitati avendo delle vere e proprie condizioni di coagulo intravascolare). Tutte le varie forme e alterazioni sono legate ad alterazioni intracellulari o di membrana. Un'altra anomalia legata ai globuli rossi può essere ad esempio la presenza di inclusioni. Quando parliamo di inclusioni, parliamo di qualcosa che assume una tintorialità all'interno del globulo rosso, ovvero un globulo rosso che nella sua forma matura può contenere delle sostanze precipitate che a seconda della colorazione potranno dunque essere messe in evidenza. I più frequenti, dal punto di vista semi-fisiologico, sono i **corpi di Heinz**, legato alla carenza di glucosio-6-fosfato deidrogenasi, che quindi favoriscono in questi soggetti a manifestare la malattia del favismo, non avendo un enzima responsabile alla detossificazione di questa sostanza, accumulando così sostanze tossiche che non sono degradate e queste risiedono all'interno dei globuli rossi sotto forma di puntature grigio-nere. Esistono inoltre le forme immature dei globuli rossi, ovvero legate ad un'alterata funzionalità del midollo: quando nel midollo non esiste una corretta attività ematopoietica, cioè la parte mieloide non produce un differenziamento eritroide opportuno (anziché partire dal progenitore, l'eritroblasto, reticolocita ed in fine eritrocita) si fermano a degli stadi evolutivi particolari. L'arresto funzionale, quindi la non completa maturazione dell'eritrocita, comporta il ritrovare queste forme immature anche nel sangue periferico. Queste hanno lo stesso meccanismo di homing, vengono così trasportate nel sangue periferico ma non come eritrociti maturi. Le condizioni che più frequentemente si possono ritrovare sono 2: l'**eritroblasto** (blasto sta per forma staminale immatura che si dovrebbe trovare solo ed esclusivamente nel midollo) e il **reticolocita** che dovrebbe totalmente perdere il proprio nucleo ma invece lo presenta in porzioni frammentate, che portano alla formazione di un piccolo reticolo all'interno. Condizioni completamente diverse l'una dall'altra, generalmente l'eritroblasto è una forma immatura dovuta ad una

carezza metabolica che potrebbe essere legata ad eritropoietina insufficiente, vitamina b12 o folati. In questo caso gli eritroblasti possono essere legati ad una condizione fisiologica (gravidanza oppure neonato), ovvero la gravidanza ha indotto la madre ad avere una maggiore emopoiesi che non è arrivata a maturazione completa, mentre nel neonato è indicativo di una eritropoiesi midollare neonatale non efficace o non ancora completa per carezza metabolica dovuta al fatto che la madre non ha fornito quantità sufficienti di eritrociti per stimolare il midollo.

Quindi esistono condizioni fisiologiche e condizioni invece conclamate patologiche, come ad esempio l'**eritroblastosi fetale**. Questa è una condizione nella quale gli eritrociti del neonato (quindi indipendente a questo punto dalla madre), dovuto ad una ipofunzionalità midollare, da condizioni di travaglio prolungato o da deficit immunologico, non sono prodotti in maniera corretta (il midollo del neonato non produce in maniera corretta tutte le porzioni di cellule eritrocitarie mature).

Ovviamente abbiamo altre forme che inducono lo stesso tipo di risposta, come anemia e trombosi, tutte condizioni però legate ad un metabolismo alterato. Un danno metabolico del midollo può produrre forme blastiche degli eritrociti, cioè aplastiche. Nel caso dell'anemia aplastica del midollo, il midollo non produce completa maturazione delle forme eritrocitarie, che non raggiungono la maturazione e si ritrovano circolanti nel sangue. Una percentuale < 1% è ancora fisiologicamente accettabile, mentre se > 1% è già conclamata patologica. Un blasto essendo dunque una cellula immatura assumerà una tintorialità totalmente differente da quella dell'eritrocita. Il reticolocita è la fase ultima, maturativa, dell'eritrocita quindi il globulo rosso prima di arrivare a maturazione completa deve perdere completamente il nucleo, questo generalmente avviene tramite frammentazione apoptotica, maggiore sarà la frammentazione fisiologica, maggiore sarà la perdita del nucleo eritrocitario, completa sarà la funzionalità del globulo rosso. Se restano piccoli frammenti all'interno, questi assumono il nome di globulo rosso giovane, non ha raggiunto la completa maturazione, presenta piccoli frammenti nucleari. Il reticolocita o globulo rosso giovane è indice di un'attiva emopoiesi midollare, queste forme eritrocitarie sono un indice diagnostico di una ripresa midollare in seguito ad un'anemia o ad un'emolisi, perché durante la fase di anemia e durante la fase di emolisi, il midollo viene stimolato a lavorare di più, portando alla formazione di queste cellule giovani che possono non perdere del tutto il nucleo. Ovviamente esiste una percentuale al di sotto del quale risulta essere fisiologico, mentre, al di sopra della quale risulta essere un indice diagnostico di una dichiarata ematopoiesi (intorno all'1.5 nel sangue periferico è ancora accettabile).

LEZIONE 5.

LE PIASTRINE.

Le **piastrine** sono una frammentazione del megacariocita, per questo non possono essere coltivate in vitro e non possono essere mantenute per un tempo lungo in maniera vitale, infatti hanno una emivita molto breve. Il megacariocita è una cellula di grandi dimensioni che, durante la fase di maturazione e differenziamento a livello staminale nel midollo, va incontro ad una serie di modificazioni dal megacarioblasto al megacariocita. A questo punto la componente di frammentazione è talmente elevata da frammentare sia il nucleo che la porzione di citoplasma e queste piccole porzioni sono appunto le piastrine che vanno in circolo ematico.

Le piastrine hanno tantissime funzioni, di cui le più importanti sono quelle correlate con la coagulazione e il sistema della emolisi. Il rilascio da parte di particolari fattori di adesione, di integrità del vaso e di porzioni di componenti citoplasmatiche, come alcune proteasi, crea delle condizioni di aggregazione.

L'**aggregazione piastrinica** è un fenomeno molto complesso che permette di creare il trombo bianco, cioè la prima porzione con cui gli aggregati piastrinici possono creare una sorta di tappo nella lesione del vaso arterioso o venoso. Su questo tappo si ha poi la trasformazione del fibrinogeno in fibrina che raccoglierà e terrà al suo interno tutti gli elementi figurati del sangue creando il trombo rosso, ovvero la condizione per la reale chiusura della lesione vasale. Tutto questo equilibrio è regolato da un sistema di proteasi che inducono tagli del fibrinogeno, ma anche da una cascata proteolitica che fa parte della coagulazione stessa.

Questo equilibrio deve essere modulato anche da **inibitori della coagulazione**, quindi da fenomeni fibrinolitici successivi o da meccanismi di controllo della coagulazione. Se non ci fossero questi sistemi di inibitori della coagulazione (eparina o sostanze eparino simili) al minimo stimolo vasale, pressorio, noi avremmo un fenomeno coagulativo e quindi entreremmo subito nel rischio della trombosi, cioè la capacità delle piastrine di non essere finemente regolate nel fenomeno della creazione del trombo e di favorire sempre più spontaneamente la formazione di un trombo, ovvero la formazione di un coagulo intravascolare. Ciò porta all'organismo ad avere delle conseguenze gravi, perchè se i microtrombi dovessero prendere il torrente circolatorio, potrebbero andare ad occludere capillari venosi e arteriosi, creando un deficit di ipossia e nutrimento che assume il nome di infarto se avviene nel cuore, nel rene o nel polmone, o ictus se avviene a livello cerebrale.

Quindi le piastrine, pur essendo poche centinaia di migliaia, con una emivita molto breve, giocano un ruolo importante sia dal punto di vista fisiologico che patologico. Ogni volta che si parla di piastrine si parla di due condizioni:

- Condizione di **ipofunzionalità**: consiste nella scarsa produzione o presenza di piastrine all'interno del sangue; essa va sotto il nome di **trombocitopenie**.
- Condizione di **iperfunzionalità**: portano alla trombocitosi, dovuta a infezioni o malattie immunoproliferative.

Le trombocitopenie possono essere facilmente riconosciute in base al valore definito dall'MPV (valore medio del volume della piastrina). Da questo valore infatti possiamo capire se il volume è correlato con un difetto che è dovuto o ad un eccesso di distruzione delle piastrine o ad un limitato funzionamento midollare. Ciò è molto importante perché abbiamo due condizioni diametralmente opposte tra di loro. Nella condizione della distruzione il volume è molto più grande; quando invece la produzione da parte del midollo è ridotta, avremo un volume minore e quindi piastrine che hanno dimensioni molto più piccole ($< 2\mu\text{m}$).

Le trombocitopenie possono essere anche distinte in acute e croniche. Le acute sono date dall'utilizzo di farmaci, infatti sia gli antibiotici che gli antiinfiammatori hanno una correlazione con l'abbassamento del livello piastrinico e ciò suggerisce il fatto che la piastrina entra anche nel meccanismo di risposta infiammatoria, infatti i lecotrieni, i trombassani, sono tutti mediatori dell'infiammazione e vengono rilasciati dalle piastrine.

Quando c'è un'infiammazione la prima cosa che notiamo è il calore (iperemia) l'aumentata permeabilità dei capillari ma soprattutto il rossore; il rossore è dato dal rilascio di questi mediatori (lecotrieni, trombassani ecc...) che fanno lisi di componenti ematiche o strutture correlate. Gli antiinfiammatori abbattano questo sistema, creano una risposta minore, e inibiscono la funzionalità delle piastrine. Infatti quando si fa una terapia antiinfiammatoria è bene non fare le analisi, ma aspettare 4-5 giorni per poter ripristinare la normale funzionalità piastrinica.

Le trombocitopenie croniche restano stabili nel tempo; l'organismo si adatta a ciò e quindi combatte questa infiammazione ma la tollera aumentando la secrezione di alcune sostanze. Questo aumento di secrezione avviene attraverso una diminuzione della produzione midollare (abbassamento del numero di piastrine), oppure attraverso la distruzione delle piastrine da parte di anticorpi anti PLT, ovvero anti piastrine.

METABOLISMO DEL FERRO.

Il ferro esiste in forma libera o in forma coniugata con più molecole proteiche che sono trasportatrici o che possono immagazzinare il ferro. Ma esiste anche un sistema network che permette al ferro di essere utilizzato e distribuito nell'organismo. Quando parliamo di metabolismo del ferro parliamo di diversi aspetti: il fenomeno dell'assorbimento intestinale, la distribuzione del sangue e l'utilizzo del ferro nel midollo.

Il ferro ogni volta che deve essere legato deve essere in forma ossidata (Fe^{3+}), perché Fe^{2+} è metabolicamente meno attivo.

Quando parliamo di assorbimento di ferro dalla dieta parliamo di cellule intestinali, o meglio cellule presenti sulla parete del colon che presentano dei microvilli, ovvero delle espansioni della membrana che servono per aumentare la superficie di assorbimento delle sostanze. In questo caso il ferro dal lume dell'intestino, attraverso

l'alimentazione, viene metabolizzato e reso disponibile. La cellula intestinale filtra, ha una capacità semplice di captazione e lo fa entrare all'interno della cellula: nel lume intestinale, in pratica, il ferro viene assorbito spontaneamente all'interno della cellula del colon. A questo punto il ferro può essere accumulato dalla cellula del colon attraverso una molecola proteica chiamata ferritina e può essere utilizzato direttamente dalla cellula (del colon). La ferritina è una molecola molto complessa, di grandi dimensioni, e ha la capacità di immagazzinare nelle proprie pieghe strutturali tridimensionali un'enorme quantità di atomi di ferro. Quindi la ferritina è una proteina di accumulo di ferro. Essa tende ad accumulare quantità di ferro sempre maggiori fino ad arrivare ad una condizione di saturazione.

Questo è un sistema di immagazzinamento utilizzato per non lasciare ferro libero, perché il ferro libero è altamente reattivo. Il ferro libero in presenza di componenti di stress ossidativo può indurre uno stato ossidativo molto forte, generando una condizione di ossidazione della struttura cellulare.

Il ferro rientra in quelle reazioni chiamate **reazioni di Fenton**, che sono alla base dello stress ossidativo, ovvero alla base della trasformazione di ossigeno e idrogeno in elementi molto reattivi che non attaccano più le strutture del ferro, ma sono libere di indurre modificazioni nelle proteine, lipidi o DNA. Quindi tutto lo stress ossidativo viene modulato in presenza di ferro.

Il ferro è presente anche nel midollo per formare i globuli rossi e l'emoglobina. In questo caso il ferro però non può essere veicolato come ione, perché creerebbe le condizioni di stress ossidativo. Quindi la cellula spinge il ferro verso la parte basale dell'intestino (duodeno) dove sulla parete delle cellule che lo costituiscono (enterociti) sono presenti due molecole proteiche che cooperano tra di loro per trasportare il ferro da dentro la cellula dell'intestino al sangue periferico, dove verrà poi legato per essere trasportato.

Queste molecole proteiche sono la **ferroportina** e la **efestina**. Queste due molecole cooperano tra di loro scambiando degli elementi elettrolitici; l'efestina è una proteina a base di rame e partecipa con la ferroportina nel creare le condizioni di un passaggio attraverso la membrana basale dove il ferro viene rilasciato nel torrente ematico dei vasi sanguigni.

Nel sangue esiste una ulteriore molecola proteica che lega il ferro che è la transferrina. Essa serve per il trasporto dello ione ferroso. In questo caso la transferrina è presente in due forme molecolari: la forma che non lega il ferro (**apotransferrina**) e la forma che lega diverse quantità di ferro (**transferrina**). Tra l'apotransferrina che non contiene ferro e la transferrina che lega il ferro esiste un equilibrio, in modo tale da poter valutare qual è il livello di saturazione percentuale della transferrina.

Quando la transferrina è legata al ferro essa trasporta il ferro nel midollo ed entra nella nicchia midollare; a questo punto il ferro può creare le condizioni di sintesi dell'emoglobina da mettere all'interno dei globuli rossi.

Gli eritroblasti, che hanno sulla loro superficie il recettore specifico per la transferrina, legano transferrina e quindi il ferro. Se gli eritroblasti non hanno abbastanza recettori sulla loro superficie, allora avremo degli eritrociti anemici. Non tutto il ferro trasportato dalla transferrina viene captato dai recettori degli eritroblasti, ciò perché una componente elevata di ferro deve essere elaborata successivamente.

Il macrofago, in ambiente midollare, permette l'ulteriore metabolizzazione del ferro che proviene dal sangue periferico. Ciò avviene perché il macrofago ha, sulla propria superficie, due molecole proteiche che permettono al ferro di passare dall'ambiente esterno a quello interno e viceversa. Queste due molecole sono la ferroportina e la ceruloplasmina. Si tratta di due molecole ricche di rame che scambiano con la ferroportina ioni per poter fare entrare il ferro all'interno della cellula, e all'interno della cellula il ferro ha di nuovo le tre vie: un uso diretto, un accumulo nella ferritina, oppure attraverso il sistema ferroportina-cerulo plasmina, permette la fuoriuscita del ferro e il legame con la transferrina. La transferrina nel sistema del midollo si lega all'eritroblasto, forma emoglobina e da origine al globulo rosso.

Ogni volta che abbiamo la formazione dell'emoglobina e il suo inserimento all'interno dell'eritrocita, l'eritrocita diventa maturo, torna nel circolo sanguigno, compie i suoi 120 giorni medi di vita, dopo di che arriva nella milza dove viene distrutto, l'emoglobina viene distrutta e il ferro di nuovo verrà legato dal macrofago e ritorna al midollo per fornire substrato per la transferrina e si ha la distribuzione del ferro.

Quando parliamo di contenuto totale di ferro, l'unità funzionale si chiama **eritrone**, cioè il sistema che fa capo all'eritrocita ma è molto più complesso e comprende altre vie. L'eritrono è il sistema funzionale che serve per poter avere una adeguata quantità di ferro (2,5 g per l'uomo 1,8 g per la donna). Questo ci permette di capire il fabbisogno medio di ferro di cui un organismo ha bisogno. Se la quantità di ferro diventa carente tutto il sistema ciclico ne soffre. La dose giornaliera di ferro che deve essere introdotta da un organismo è di 2mg/dl, perché una parte di ciò che noi assorbiamo va direttamente nel plasma e la quantità di assorbimento deve essere uguale alla quantità di ferro che viene persa. Se questo equilibrio non viene mantenuto si ha una sofferenza sia nel deposito che nella sintesi, e quindi si crea uno sbilanciamento verso l'anemia (se è a favore dell'eliminazione) oppure verso un eccessivo accumulo di ferro (se è a favore della sintesi).

La transferrina è una proteina che presenta al suo interno una percentuale di saturazione di ferro e deriva da una molecola che, invece, è priva di ferro (apotransferrina). La molecola di apotransferrina che lega una adeguata quantità di ferro assume il nome di transferrina e presenta una diversa percentuale di saturazione. La distribuzione della transferrina è importante perché è il sistema che distribuisce il ferro nei diversi settori, e quindi rappresenta il perno centrale dell'omeostasi. La transferrina è presente in 3-4 mg e questa minima quantità è sufficiente per trasportare tutto il ferro (2,5g/1,8g). Quindi pochi milligrammi di transferrina possono legare il 100% del fabbisogno di ferro.

N.B.: Quando si assume del ferro, se esso non è adeguatamente acidificato, non lo assorbiamo.

Oltre che dalla transferrina, il ferro può essere reso disponibile anche da altre fonti; lo possiamo avere per esempio dal fegato. Il fegato è l'organo per eccellenza in cui si accumula maggior quantità di ferritina.

Quando l'eccesso di ferro legato alla ferritina diventa modulato in maniera patologica si ha l'**emocromatosi**, che è una patologia molto seria dovuta all'accumulo di ferro. Ciò significa che esiste un bilanciamento tra la ferritina epatica e la transferrina che deve essere mantenuto. Se la transferrina non trova il ferro attraverso l'alimentazione, si avrà una transferrina che non lega il ferro ad una percentuale di saturazione corretta, quindi non avrà sufficiente quantità di ferro e andrà a prendere il resto del ferro che le serve dalla ferritina del fegato. Quindi avremo una apotransferrina alta, una ferritina poco saturata e che diminuisce.

Altri organi in cui possiamo trovare ferro sono: i muscoli (presentano mioglobina che lega il ferro). Oltre alla mioglobina ci sono anche i citocromi che ci permettono di avere una perfetta fosforilazione ossidativa, ovvero una detossificazione di sostanze esogene.

La perdita di ferro può essere anche di 2mg nell'arco della giornata. Cioè esattamente ciò che noi possiamo introdurre attraverso la dieta. Ciò deve far capire che non possiamo non introdurre ferro all'interno della dieta. Esiste anche un sistema di consumo del ferro. Il Macrofago, per esempio, assorbe ferro. Il ferro può rimanere o all'interno del macrofago, e quindi accumularsi come ferritina, oppure può essere perso.

Quando parliamo quindi di dosaggio del ferro, in biochimica clinica si parla di **assetto marziale**, ovvero il contenuto di ferro in tutte le sue forme. Con "fare il dosaggio del ferro" si intende la **sideremia**, ovvero la quantità di ferro presente nel sangue che principalmente è legata alla transferrina; la sideremia ha un valore che va da 100 a 150 µg/dl. È importante valutare il valore della sideremia perché ciò mi permette di capire se il ferro è omogeneamente distribuito in tutte le sue porzioni, perché la sideremia è fatta di tanti aspetti: il 65% di essa è legata all'emoglobina, il 30% alla ferritina, il 4% citocromi e mioglobina e l'1% serve da scambio per i diversi sistemi.

Quindi la sideremia serve a capire se la quantità di ferro introdotta è corretta, però poi i suoi diversi possibili legami permettono di capire se stiamo bene e se distribuiamo correttamente il ferro introdotto.

La diminuzione o l'aumento della sideremia sono dei campanelli d'allarme. Se si ha una **ipersideremia** bisogna fare attenzione perché il ferro, in quantità più elevate rispetto alla soglia, può essere negativo; può portare a stress ossidativo e tossicità da ferro. Una particolare forma si chiama **emocromatosi**. Essa è un danno epatico dovuto all'eccesso di ferro. La **necrosi epatica** (distruzione del fegato) invece è una patologia geneticamente ereditaria ed è dovuta al fatto che il ferro non si lega alla ferritina ma si accumula nel fegato.

L'aumento del ferro quindi è legato anche a fenomeni patologici quali per esempio l'**anemia emolitica** che consiste

in globuli rossi che tendono a rompersi spontaneamente. Questa lisi cellulare porta alla liberazione dell'emoglobina, la quale va incontro a degradazione e al conseguente rilascio del ferro.

L'**iposideremia** invece consiste in una diminuzione del ferro all'interno del sangue. Ciò può essere legato a reattività in cui c'è un maggior fabbisogno di ferro (non chiedetemi cosa voglia dire, ho riascoltato questa frase diecimila volte), la gravidanza per esempio. La madre deve produrre emoglobina per gli eritrociti del feto, quindi aumenta la concentrazione di emoglobina, che va verso il feto, ma depaupera le proprie riserve di ferro.

ANEMIE E TALASSEMIE.

Per anemia si intende la condizione in la concentrazione dell'emoglobina (Hb) all'interno dei globuli rossi che comporta un ridotto trasporto di ossigeno.

La talassemia è una malattia ereditaria del sangue che comporta anemia.

FERRITINA SIERICA E TRANSFERRINA SIERICA.

La ferritina fa da accumulo di ferro, mentre la transferrina funge da trasportatore di ferro. Anche con la ferritina si possono avere due condizioni: **iperferritinemia** e **ipoferritinemia**.

Se la ferritina nel sangue è molto bassa, significa che il ferro accumulato è stato utilizzato per coprire delle carenze e quindi si pensa subito ad una sideropenia, ovvero un'anemia legata alla carenza del ferro. La ferritina cede ferro all'organismo e quindi diventa più bassa e lega meno ferro.

Se invece la ferritina è molto alta si tratta comunque di un campanello d'allarme, perché può portare a stress ossidativo e stimola la proliferazione cellulare. Inoltre, trovare elevate quantità di ferro nella ferritina può essere dovuto anche ad una iperfunzionalità della milza, la quale distrugge eccessivamente i globuli rossi, liberando altro ferro che viene accumulato nella ferritina.

La transferrina ha il compito di decidere dove e come trasportare il ferro. Se la transferrina aumenta significa che distribuisce una maggiore quantità di ferro verso gli organi, ciò avviene in gravidanza, o quando si ha una carenza di ferro. Se si ha invece un basso livello di transferrina, si può pensare ad un'infezione cronica oppure a malnutrizione. Per malnutrizione si intende una patologia che è legata soprattutto alla scarsa o errata assunzione di cibo (ferro) ed uno scarso assorbimento.

TIDC è la capacità totale legante del ferro. Questo è il sistema con cui si valuta la percentuale di ferro nella transferrina. Essa può andare da 0 a 100 (0 apotransferrina, 100 transferrina).

Questo è il sistema di saturazione da parte del ferro della transferrina. Mediamente e fisiologicamente un individuo presenta il 30-40% di saturazione, quindi circa 1/3 della molecola transferrinica lega il ferro, il resto viene legato a seconda dei fabbisogni.

Il livello di TIDC può essere normale, in eccesso o in difetto rispetto a quello che è il range di normalità. E' utile valutare ciò perché ci dice se la transferrina lega e trasporta grandi percentuali di ferro oppure basse percentuali. Se la sua capacità è in aumento, essa lega molto più ferro per poterlo trasportare, e quindi si dice che in questo caso il sistema ha una carenza.

Se invece il TIDC è diminuito, in questo caso si avranno delle anemie emolitiche: condizione in cui il globulo rosso tende ad avere o una minor quantità di emoglobina o una perdita perché si è rotto il globulo rosso. In questo caso quest'ultimo viene degradato, eliminato attraverso l'emuntorio fecale per cui la capacità di legame diventa più bassa perché non c'è ferro, in quanto esso viene perso attraverso l'emuntorio fecale.

Il ferro per poter essere captato nel midollo dagli eritroblasti. Ciò avviene mediante i recettori della transferrina. In questo modo il ferro entra all'interno dell'eritroblasto, quest'ultimo sintetizza emoglobina, perde il nucleo e si trasforma in eritrocita che contiene solo emoglobina con il ferro legato. Tanto più i recettori sono presenti, tanto più siamo in una condizione di anemie, perché più eritroblasti mostreranno recettori per captare più transferrina e quindi più ferro.

L'eritroblasto che invece mostra scarsi recettori nel caso delle anemie aplastiche. Ciò significa che il midollo in questo caso va in aplasia, ovvero non funzionamento. Se il midollo non funziona non produce eritroblasti, quindi

anche eritrociti ed emoglobina, e si avrà un'anemia primordiale, ovvero di base, il che significa che a quel punto l'eritroblasto non mostra recettori non lega il ferro, non produce emoglobina.

ANEMIE.

Quando parliamo del ferro, da un punto di vista patologico, parliamo di anemie. L'anemia è un basso livello di concentrazione dell'emoglobina all'interno dell'eritrocita. Ci sono ovviamente delle variazioni di concentrazione che portano all'anemia che variano a seconda dell'età e del sesso.

Ovviamente per vedere realmente se un individuo è anemico o meno bisogna ripetere le analisi più volte attraverso l'MCV, cioè la concentrazione media all'interno del volume eritrocitario.

Definizione di anemia secondo WHO

Gruppo	Emoglobina (g/dL)
Neonati e bambini, 6 mesi-6 anni	<11.0
Donne in gravidanza	<11.0
Bambini, 6-14 anni	<12.0
Donne adulte	<12.0
Maschi adulti	<13.0

Vengono distinte 3 situazioni differenti:

- **Microcitiche** (es. anemia sideropenica, talassemie) emoglobina bassa e globuli rossi più piccoli del normale. Sono tipiche delle anemie mediterranee.
- **Normocitiche** (es. neoplasie) è un'anemia con un valore di emoglobina più basso, ma la forma e la grandezza dell'eritrocita è perfettamente normale. Quindi è anemico ma normocitico.
- **Macrocitiche** (es. carenza B12 e folati) basso contenuto di emoglobina. Cellula eritrocitaria più grande del normale. Ciò avviene quando l'eritrocita non arriva a maturazione completa. Ha uno step di maturazione più lento perché ha carenza di step metabolici.

Esistono tanti tipi diversi di anemie dettate dal sistema fisiopatologici.

Si distinguono in 4 sistemi di difetti:

	Difetto di produzione	Difetto di sopravvivenza	
GR normocitici + reticolocitopenia	Difetto di proliferazione Anemia da malattia cronica Patologia renale (stati di bassi livelli di eritropoietina) Anemia di Fanconi Sindrome Blackfan-Diamond Parvovirus Farmaci o tossine Anemia sideropenica, deficit produzione midollare infiammazioni e infezioni, malattie metaboliche	Emolisi Emoglobinopatie Anemie emolitiche immuni Cause infettive dell'emolisi Anomalie della membrana Anomalie metaboliche Emolisi meccanica Farmaci o tossine Malattia di Wilson	GR normocitici + reticolocitosi
	GR micro/macrocitici + reticolocitosi	Difetti di maturazione Carenza di B ₁₂ ; carenza di folati Carenza di ferro Anemia sideroblastica Sindromi talassemiche Avvelenamento da piombo	

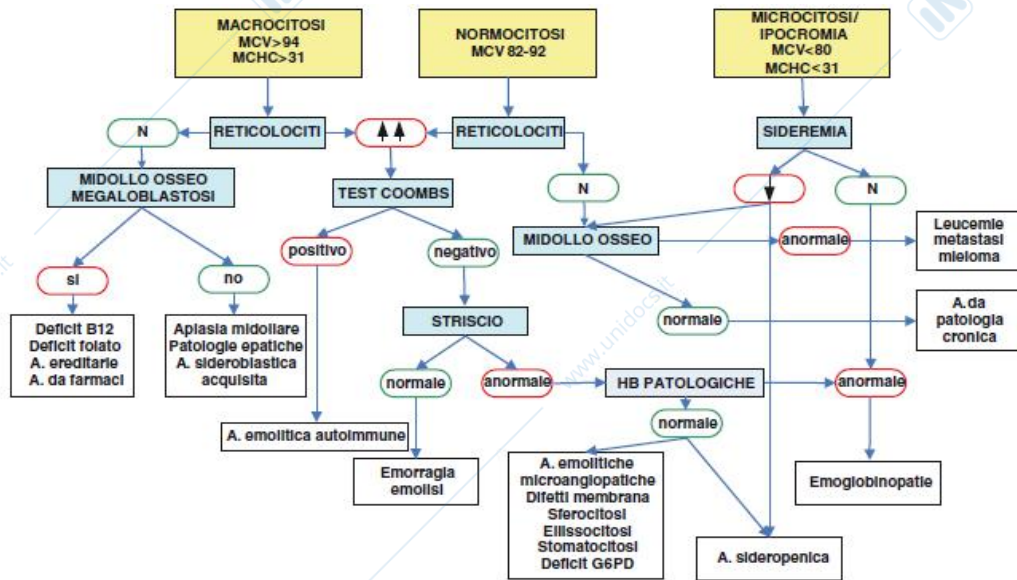
Quando il difetto è di produzione il midollo non è capace di far proliferare le cellule. Quindi i globuli rossi hanno una forma normale, sono anemici (meno emoglobina) ma hanno una **reticolocitopenia**, ovvero hanno meno reticolociti. Ciò suggerisce quindi che il midollo ha un deficit: produce troppo ferro che non può essere utilizzato, o produce un'insufficiente quantità di ferro. Si parla di **anemie sideroferriche**, ovvero anemie che sono correlate con la bassa quantità di ferro circolante.

Quando si definisce un difetto di produzione si tiene conto anche del fatto che all'interno del midollo si possono avere cellule che non hanno un corretto metabolismo. In questo caso il midollo produrrà globuli rossi più grandi o più piccoli, ma all'interno non si formerà l'emoglobina. Quindi si avrà un'anemia e anche una differente grandezza

dei globuli rossi. In questo caso, mancando il sistema metabolico, non viene prodotta una quantità adeguata di emoglobina e l'eritroblasto non forma l'eritrocita maturo, ma intermedio, ovvero il reticolo cita (eritrocita con il nucleo).

ALGORITMI DIAGNOSTICI.

Gli algoritmi diagnostici sono dei sistemi attraverso i quali mettendo insieme tutte le possibilità diagnostiche, si trovano delle strade da seguire per comprendere perché un sistema è alterato. Quindi è un modo per capire qual è la spiegazione di un determinato danno.



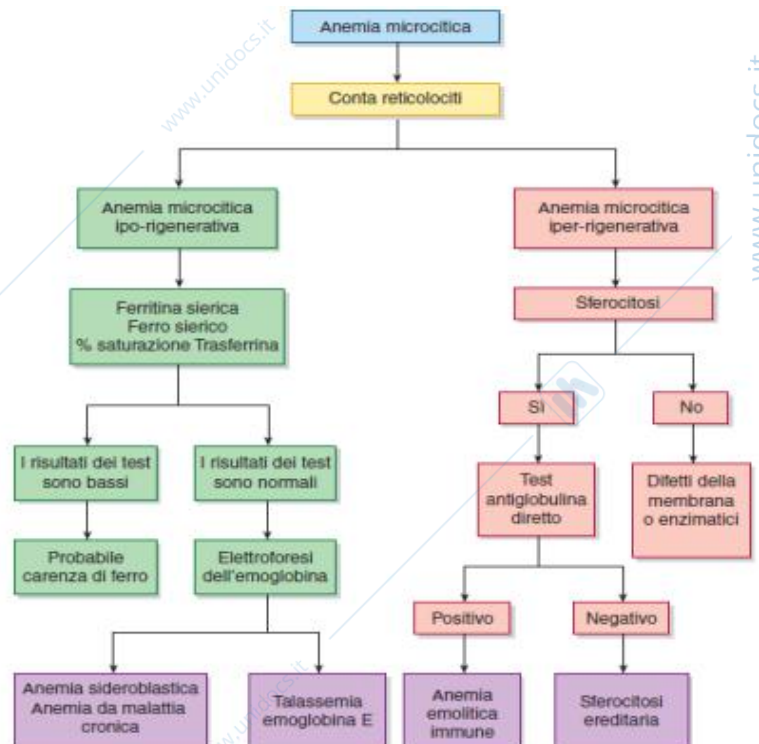
Se noi abbiamo per esempio una normocitosi, però un contenuto anemico dell'emoglobina, la prima cosa che andiamo a vedere è quanti sono i reticolociti.

I reticolociti possono essere o nella norma (N) oppure alterati. Se sono nella norma occorre andare a guardare cosa c'è nel midollo.

Se invece abbiamo dei reticolociti molto elevati, va fatto un test di coombs, che è un test diretto. Se il test è positivo si vanno a cercare degli autoanticorpi, o comunque qualcosa che induca ad una emolisi spontanea.

Le anemie microcittiche sono definite anche anemie mediterranee. Il soggetto che presenta una anemia microcittica può avere un'ottima qualità della vita prestando attenzione ad alcuni fattori, quali per esempio l'altitudine. Un soggetto avente una anemia microcittica non può salire oltre i 2000 metri, perché avendo una minore quantità di emoglobina il globulo rosso è più piccolo, lega meno ossigeno e può andare in ipossia.

Occorre valutare se l'anemia microcittica è correlata ad altre problematiche quali una talassemia, oppure se si tratta di una banale carenza da ferro.



LEZIONE 6.

LA BIOCHIMICA CLINICA DEL SANGUE

EMOGLOBINA

L'emoglobina possiede due coppie di subunità globuliniche che sono unite da due legami non covalenti, formando così 4 gruppi eme. La funzione dell'emoglobina è quella di trasportare l'ossigeno ai tessuti e agli organi. La capacità di trasportare e rilasciare l'ossigeno è strettamente correlata alla sua struttura proteica.

Fe³⁺ --> Il ferro ha la capacità di legare i 4 anelli dell'emoglobina. Il legame del ferro utilizza legami non covalenti, questo dà la possibilità di avere dei diversi stati di ossidazione. I legami di coordinazione hanno una nuvola elettronica più interna, in questo caso la parte ionica del ferro non viene considerata. ogni volta che avviene un legame all'interno dell'emoglobina si ha uno ione ferrico Fe³⁺, questo ci permette di avere un legame di coordinazione dei 4 anelli per ottenere una struttura che è in grado di poter agire con un legame transitorio con l'ossigeno.

Il **gruppo eme** possiede una struttura composta da quattro biostrutture geneticamente predeterminata formate **catene costitutive** che non variano mai e da **catene varianti** che cambiano in base all'età e all'ambiente. le catene varianti cambiano in base a delle varianti epigenetiche e in base alla fase di sviluppo della persona : fase embrionale, fase fetale e fase adulta. L'altra componente del gruppo eme è la **globina** , è la porzione proteica dell'emoglobina, genera una proteina globulare standardizzata dal punto di vista genetico, è distinta in *globina alfa e beta*.

La **globina alfa** è composta da 5 geni localizzati nel cromosoma 16 braccio corto.

La **globina beta** è composta da 6 geni che si trovano nel braccio corto del cromosoma 11, ciò indica che le variazioni della catena possono produrre delle molecole che non legano efficacemente l'emoglobina stessa.

L'emoglobina a livello embrionale fetale e adulto sono diverse. L'**emoglobina embrionale** si forma nei primi tre mesi della gravidanza, questa riconosce la necessità di portare all'embrione una grande quantità di ossigeno. una volta superato il terzo mese si passa **all'emoglobina fetale**, in questo periodo il feto riesce a produrre l'emoglobina composta da due *catene alfa costitutive* che saranno presenti anche nell'adulto e da due *catene gamma* che sono esclusivamente fetali, queste servono perchè il feto non essendo a diretto contatto con l'ossigeno esterno prima di legarsi ad esso deve essere in grado di legare l'emoglobina della madre e sono successivamente potrà acquisire l'ossigeno che proviene da esso, lo stesso vale per la cessione dell'anidride-carbonica. Questa emoglobina fetale può rimanere presente anche in età pediatrica per poi scemare man mano che l'individuo cresce. Dopo la nascita, l'individuo assume la totale autonomia e anche il midollo osseo produce l'emoglobina, in questo periodo quindi si produrrà l'emoglobina **adulta composta** da *due catene alfa e due catene beta o delta*.

Nell'adulto vi sono due catene classiche di emoglobina: l'emoglobina A e l'emoglobina A2. Gli individui che possiedono l'**emoglobina A2** rappresentano il 5-10% e hanno solamente una catena aggiuntiva, ma dal punto di vista funzionale non cambia nulla. Gli individui che possiedono invece l'**emoglobina A** rappresentano il 95%, queste hanno due catene alfa e due catene beta. Le più frequenti alterazioni dell'emoglobina sono: l'emoglobina C e l'emoglobina S.

L'**emoglobina S** è quella dell'anemia falciforme, l'**emoglobina C** è quella della drepanocitosi. In entrambe vi è una variazione della sequenza amminoacidica e anche della funzione dell'emoglobina. In questo caso si parla di **emoglobinopatie** ovvero una variazione nella sintesi della catena dell'emoglobina, queste anomalie possono colpire tutte le 4 strutture della proteina (struttura primaria secondaria terziaria e quaternaria). Quando varia la struttura primaria della proteina si può avere un'emoglobina anormale ma innocente, la sequenza amminoacidica può essere alterata però l'emoglobina non cambia la struttura e mantiene la funzione. Ogni volta che si osservano delle alterazioni nella catena amminoacidica nella tasca di alloggiamento dell'eme, ovvero dove avviene la funzione primaria , ci sono delle variazioni in negativo della funzionalità, si avrà una minor affinità con l'ossigeno. Le mutazioni avvengono in posizioni differenti; l'emoglobina S ha la mutazione dell'aminoacido 6 della catena da glutammato a valina, in questo caso abbiamo un cambiamento della struttura che porta ad una forma a falce ecco perchè anemia falciforme. nell'emoglobina C invece avviene una variazione dell'aminoacido 6 della catena da

glutammato a lisina. Quando si parla di *emoglobina H* tipica della talassemia si parla **dell'emoglobina di Bart**, costituita solo dalle catene alfa, queste due catene hanno un'elevata affinità dell'ossigeno ma sono incapaci di cederlo, quindi si ha una morte intrauterina per anossia, diversamente *l'emoglobina F* è fatta da α_2 e γ_2 . L'emoglobina alterata ha delle mutazioni qualitative o quantitative che portano a delle anemie che per qualità o quantità hanno una modificazione dell'emoglobina stessa, esse possono portare a delle macrocitosi, microcitosi o a delle normocitosi,

- **macrocitosi** --> più grandi del normale
- **microcitosi** --> più piccolo del normale
- **normocitosi** --> il globulo rosso è di grandezza normale

Da queste tre si riesce a percepire la differenza di quantità dell'emoglobina presente nel globulo rosso e quindi abbiamo le: **ipocromiche, normocromiche e le ipercromiche.**

- **ipocromiche** --> la quantità dell'emoglobina è più bassa del normale
- **normocromiche** --> la quantità di emoglobina è normale
- **ipercromiche**--> la quantità di emoglobina è più alta del normale

Le anemie vengono identificate quando si ha una minor quantità di emoglobina quindi nelle condizioni ipocromiche che possono essere correlate con la presenza dei **reticulociti** ovvero la forma immatura del globulo rosso. In questo caso il midollo ha avuto lo stimolo di produrre una maggior quantità di globuli rossi che però non sono stati maturati correttamente. Se la presenza dei reticulociti è maggiore del normale allora riscontriamo tre problemi: problemi di tipo metabolico, ovvero che mancano delle vitamine utili alla maturazione dell'eritrocita come la vitamina B12, il folato, il ferro; oppure bisogna comprendere se siamo in presenza di un'emoglobinopatia ovvero se si ha un'alterata costruzione per cui l'emoglobina non è adeguata e non produce l'eritrocita maturo, questo porta ad un'anemia ipocromica; se invece i reticulociti sono più bassi della norma bisogna confrontarsi con le solite condizioni di anemie ovvero quelle **sideropeniche**, cioè quelle da carenza di ferro. La quantità più bassa dell'emoglobina è sicuramente legata ad una presenza alterata del numero degli eritrociti presenti e quindi la sideremia, la ferritina e il ferromidollare ci aiutano a comprendere se il problema per l'eritrocita è metabolico o maturativo. Quello che osserviamo nel midollo diventa importante perché una carenza di ferro midollare porta a dei risultati alterativi, avremo una sideropenia ovvero una carenza metabolica della sintesi della parte dell'eme, l'eritrocita quindi non matura in maniera completa. Se la quantità di emoglobina all'interno dell'eritrocita è più bassa della norma ma è normale allora il problema è solo sideropenico. Se invece la quantità di emoglobina all'interno dell'eritrocita è più bassa ed è alterata geneticamente allora si parla di **talassemia**, non è più una semplice carenza da ferro ma si va ad aggiungere una mutazione nella sintesi delle catene che non accoppiandosi in maniera completa danno una minor quantità di emoglobina non funzionante all'interno dell'eritrocita.

L'elettroforesi e l'HPLC permettono di capire se il danno è solo genetico o se questo è sommato a quello metabolico. Per effettuare le valutazioni dell'emoglobina si utilizzano dei test che sono qualitativi e quantitativi, i primi ci permettono di valutare le frazioni solo per la presenza di un'emoglobina alterata, i test quantitativi invece ci permettono di capire quali frazioni ci sono e a quale percentuale sono presenti. Se il problema è solo metabolico si può modificare l'assunzione dei metaboliti per arricchire la sintesi midollare e comprendere se il difetto è di tipo metabolico innato, oppure si possono identificare le diverse catene per sapere se temporalmente queste si sono alterate per modificazioni dovute a delle infezioni o alterazioni da farmaci ecc.. I test qualitativi vengono definiti semiquantitativi perché non è mai una valutazione esclusiva della qualità della presenza e della forma dell'emoglobina ma ci dice anche percentualmente quanto ce n'è. Esistono dei test di solubilità specifiche per l'emoglobina S, questa a seconda che sia in presenza o in carenza di ossigeno in tampone fosfato ha una differente solubilità rispetto all'altro, questo perché l'emoglobina ha un legame con l'ossigeno molto particolare quindi cambiando la struttura amminoacidica, l'emoglobina avrà una maggiore o minore affinità con l'ossigeno. L'emoglobina S lega meno ossigeno dell'emoglobina A dell'adulto, quindi essa nel tampone fosfato si solubilizza meno e forma più precipitati rispetto all'emoglobina A, in questo modo avremo indicativamente una percentuale

della solubilizzazione dell'emoglobina. Come riferimento è utilizzata l'emoglobina A. Il primo test di solubilità è quello che mi dice se la torbidità è presente nel campione attraverso un test di nefelometria, quindi si osserva la limpidezza della soluzione con il lisato eritrocitario, si può capire se è presente l'emoglobina S se la torbidità del nefelometro è maggiore del 20%, se si è al di sotto del 5% di torbidità allora non è presente. si fanno due elettroforesi o su un substrato di poliaccrilammide o di agarosio. A seconda del pH con cui si fa l'elettroforesi si ha una determinata separazione. Se si utilizza un kit commerciale ad un pH 8.6 si hanno tutte le molecole cariche positivamente ciò comporta una separazione dell'emoglobina A che sarà più lenta rispetto ad un'emoglobina con la struttura alterata.

Quando ci riferiamo alla valutazione quantitativa dell'emoglobine parliamo di quei test che identificano esattamente il difetto e lo quantificano, quantizzare il difetto genetico ci permette di capire quale porzione dell'emoglobina è funzionalmente attiva. Il test quantitativo più semplice che viene fatto è sull'emoglobina fetale ci permette di comprendere quanta emoglobina fetale rimarrà ancora presente in fase adulta. Se l'emoglobina fetale non andrà a diminuire con l'avanzare dell'età allora bisogna capire se il difetto sta nel fatto che si sintetizza troppo l'emoglobina fetale o si sintetizza troppo poco l'emoglobina adulta, ogni volta che si fa il dosaggio diretto consiste nel denaturare l'emoglobina fetale in una soluzione alcalina. Le emoglobine normali non riescono a rimanere solubili all'interno di soluzioni alcaline, cambiando il pH superiore a 8 l'emoglobina Fetale è l'unica che riesce a restare solubile, tutte le altre formano il precipitato. l'altra tecnica è quella della microcolonna questa ci permette di fare una distinzione delle diverse isoforme, perchè le microcolonne a scambio ionico sono quelle che legano maggiormente proteine con affinità ionica diversa, quindi una proteina che ha una mutazione amminoacidica si lega alla resina in maniera molto più elettiva. Questa è una semplice cromatografia a scambio ionico.

Una tecnica più complessa è quella ad HPLC che ci permette attraverso un utilizzo di una colonna che ha una sequenza di catene polimeriche a diversa catena carboniosa (C12, C18) e inserendo degli standard che ci danno la lettura del picco di riferimento di osservare qual è la variazione delle differenti forme di emoglobina che noi possiamo avere. tutto ciò che esce dalla colonna verrà letto da una struttura uv-vis.

Quando si parla di talassemia ci si riferisce ad una serie di patologie caratterizzate da un'assente o ridotta sintesi di almeno una delle due catene. A seconda di quali catene sono modificate possiamo avere una patologia silente, lieve, grave o incompatibile con la vita. Si può avere una prima condizione di anemia classica ovvero una bassa concentrazione dell'emoglobina oppure una condizione di anemia emolitica che induce il globulo rosso ad andare incontro ad un fenomeno di lisi con un ulteriore abbassamento dell'emoglobina. In questo caso qualsiasi forma di emoglobina differente può generare una precipitazione dell'emoglobina all'interno del globulo rosso. La **talassemia** può colpire qualsiasi catena e in base a quella su cui ha origine si distinguono le **alfa talassemie** o le **beta talassemie**. Inoltre è possibile avere delle **sindromi talassemiche** in cui la malattia ha una manifestazione differente pur avendo sempre lo stesso quadro metabolico o genetico. All'interno delle **beta-talassemie** ci sono le **talassemie-beta-minor** e **talassemie-beta-maior**, le minor sono quelle mutazioni che riguardano una delle due catene beta avendo le due catene alfa perfettamente nella norma. di conseguenza l'emoglobina legherà meno efficacemente l'eme che lega il ferro e quindi l'ossigeno, la manifestazione può essere media o moderata. Quando invece la mutazione colpisce tutte e due catene beta esse non sono più in grado di legare l'eme e quindi l'ossigeno, la manifestazione sarà da moderata a grave, le talassemie maior sono compatibili con la vita anche se hanno la necessità di una serie di trattamenti. le sindromi **talassemiche alfa** sono molto più gravi perchè le catene alfa sono quelle costitutive, si avrebbe quindi una manifestazione grave. si distinguono in: **talassemie alfa-portatori silenti** dove solo una delle 4 catene alfa viene modificata questa genera la patologia ma è silente; **talassemia-alfa-minor** e **talassemia-alfa-maior**, le minor sono chiamate anche **tratto-alfa-tallemico** esso è composto dalla perdita di una delle due catene dell'alfa, in questo caso la manifestazione è lieve ma presente, nel soggetto comporta una carenza di trasporto dell'ossigeno nei tessuti. Quando la mutazione colpisce due o tre catene alfa allora abbiamo la talassemia maior che si identifica con **l'emoglobina H**, in cui vengono a mancare tre delle quattro catene alfa e questa ha una manifestazione grave, e con **l'emoglobina di bart** in cui mancano tutti e quattro le catene alfa, quindi l'ossigeno si lega ma non viene rilasciato, questa patologia non è compatibile con la vita, quindi si soffre di ipossia nella forma moderata o anossia.

EMOSTASI

L'emostasi è il processo che ha lo scopo di arrestare la fuoriuscita del sangue dall'albero circolatorio e di mantenere il sangue allo stato fluido. L'intero processo emostatico comprende la **coagulazione** ovvero la formazione di un coagulo e la fibrinolisi ovvero la dissoluzione del coagulo per sostituirlo con la parete delle cellule endoteliali del vaso e il trombo deve essere sciolto e reso irriconoscibile come porzione alterata. ogni volta che uno di questi due fenomeni viene a mancare si ha o un problema di perdita ematica quindi di emorragia o la formazione di trombogenesi che porta alla comparsa di trombi all'interno dei vasi sanguigni in cui però non serve.

Nel fenomeno dell'emostasi si distinguono 4 fasi. È importante che le fasi della coagulazione siano bilanciate, perché ad esempio un eccesso di coagulazione porterebbe facilmente a creare trombi (CID), mentre un difetto nella coagulazione porterebbe all'emofilia. in tutto questo all'interno del vaso danneggiato il flusso sanguigno è continuo, quindi si ha una zona tissutale che genera il trombo e una zona che serve per mantenere il flusso sanguigno regolare. Esiste un'attivazione del tessuto che avviene solo nella zona della lesione. quando il fenomeno non è più locale ma assume condizioni sistemiche si ha una patologia chiamata **CID** (coagulazione intravascolare disseminata) e questa comporta la perdita dell'integrità dello stimolo coagulativo locale per diventare un fenomeno sistemico, cioè si ha un'induzione della coagulazione in punti diversi e lontani dalla porzione di tessuto danneggiata, è un fenomeno protrombotico.

Si può anche avere un'assenza della coagulazione cioè l'**emofilia** in questo caso vi è un difetto nella coagulazione, il coagulo non si forma. Quindi il bilanciamento è tra il rapporto emofilico e trombofilico.

L'emostasi è un fenomeno particolarmente complesso, all'interno dell'endotelio ci sono delle strutture che devono essere in grado di creare un trombo ma anche di discioglierlo quindi il bilanciamento deve essere perfetto ma con le stesse sostanze presenti all'interno dell'endotelio, quello che cambia è il meccanismo con cui viene o attivato o inibito il processo. I fattori che favoriscono il fenomeno della trombosi sono i **fattori procoagulanti** ad esempio il **TPA** o l'**UPA**, essi sono fattori del tessuto che vengono rilasciati solo quando il tessuto è danneggiato, attivano il **plasminogeno**, creano le condizioni procoagulative e quindi favoriscono la formazione di un trombo. La lesione del vaso fa rilasciare alle cellule endoteliali i fattori che generano una trasformazione locale di fattori importanti del fibrinogeno in fibrina. la fibrina forma delle maglie che bloccano la fuoriuscita delle cellule ed in questo modo si viene a formare il tappo. L'endotelio produce molte altre molecole proteiche che danno luogo alla fibrinolisi, un esempio è l'antitrombina terza una molecola a base di glicosaminoglicani, simile all'eparina, che è in grado di bloccare la cascata coagulativa, limita l'aumento del coagulo. Le proteasi nella fase antitrombotica sono fattori che attivano proteasi che tagliano la fibrina, sciolgono il tappo e stimolano le cellule endoteliali a ricrescere.

BIOCHIMICA CLINICA LEZIONE 7

Prendiamo in esame i dettagli dell'emostasi.

Quando parliamo dell'intero processo emostatico dobbiamo tenere presente che questo è costituito da 4 fasi, una propedeutica all'altra e che avvengono pressoché contemporaneamente.. Le fasi prendono il nome di:

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------|
| 1. fase vasale; | 3. fase plasmatica; |
| 2. fase piastrinica; | 4. fase fibrinolitica. |

FASE VASALE

Nella prima fase, chiamata anche fase vasale, avviene la perdita dell'integrità del vaso.

I vasi sanguigni sono rivestiti dall'endotelio che presenta una sua soluzione di continuità grazie alla presenza dei sistemi di giunzioni cellulari. Questi sistemi permettono però il fenomeno della fenestrazione, ovvero il passaggio di liquidi nello spazio extracellulare (fisiologicamente non si potrà avere l'extravasazione di componenti cellulari ma solo il passaggio di liquidi), il che comporta che a seconda delle concentrazioni dei soluti nell'ambiente intravascolare o extracellulare questi possono cambiare direzione. Se in un tessuto, ad esempio, abbiamo un reperto infiammatorio, alcuni liquidi dal plasma possono spostarsi al tessuto e generare quello che prende il nome di edema,

ovvero un accumulo di liquidi negli spazi interstiziali dell'organismo.

L'edema avviene senza che ci sia una rottura del vaso sanguigno e quindi senza la perdita di integrità che non innesca il fenomeno della coagulazione.

Solo quando si ha una lesione del vaso sanguigno per una causa endogena o esogena (trauma, aumento pressorio) si ha il fenomeno della coagulazione. La lesione di un vaso comporta non solo la lesione della componente endoteliale ma di tutti gli strati che compongono il vaso. Sia che si parli di vene sia che si parli di arterie la lesione comporta la contrazione del vaso e di conseguenza la diminuzione del calibro del vaso stesso così da limitare la fuoriuscita di sangue.

Una volta avvenuta la lesione del vaso e la successiva contrazione si attivano delle molecole sulla superficie delle cellule endoteliali. L'attivazione di queste molecole permette alle piastrine (circolanti fisiologicamente nel sangue) di aderire in corrispondenza della lesione.

La fase vasale è dunque caratterizzata da due elementi: fase contrattiva della muscolatura liscia e fase di attivazione con adesione piastrinica sulla zona lesionata del vaso.

FASE PIASTRINICA

Le piastrine attivate formano rapidamente un tappo emostatico (tappo piastrinico o trombo bianco, lasso) ed è proprio grazie all'adesione delle piastrine solo nel punto di lesione del vaso che viene innescata la cascata coagulativa. Le strutture alle quali le piastrine aderiscono sono il collagene sottoendoteliale, microfibrille e altre strutture sottoendoteliali.

La cascata coagulativa avviene attraverso una moltiplicazione biochimica del sistema: l'endotelio leso rilascia ADP, variando il potenziale di membrana che espone le microfibrille di collagene. L'adesione delle piastrine all'endotelio è mediata dal **Fattore di von Willebrand o fattore VIII** (porzione della glicoproteina). Una volta adese all'endotelio, le piastrine vanno incontro a modificazioni (sfericizzazione, emissione di pseudopodi, centralizzazione di organuli cellulari e contrazione del sistema microtubulare) necessarie per liberare il contenuto degli alfa-granuli e degli organuli al loro interno. Le piastrine con il loro **PF3** (un fosfolipide di membrana esposto alla superficie e liberato durante l'aggregazione) intervengono nella formazione del **fattore Xa** (fattore decimo attivato), l'enzima più importante per la trombinogenesi.

Il microcoagulo formato durante la fase piastrinica è ancora prettamente piastrinico ma labile: il trombo bianco genera subito il primo passo per limitare la fuoriuscita di sangue. Se la lesione è di piccole dimensioni il trombo bianco basta a fermare la fuoriuscita di sangue ma non è di per se in grado di essere duraturo o di creare un successivo blocco completo della fuoriuscita di sangue.

FASE PLASMATICA

Alla fase piastrinica sussegue la fase più importante che si chiama fase plasmatica. Questa fase è caratterizzata dall'aumento della resistenza dell'iniziale trombo bianco piastrinico e dalla sua trasformazione in trombo rosso attraverso la trasformazione di una particolare molecola proteica disciolta nel plasma che prende il nome di **fibrinogeno**.

Grazie a tutti i fattori piastrinici attivati in precedenza, il fibrinogeno viene trasformato in fibrina. La fibrina forma una rete tridimensionale che blocca al proprio interno, al di sopra del tappo piastrinico, tutte le altre forme cellulari: globuli bianchi, globuli rossi e leucociti.

A questo punto il tappo presente sulla lesione acquisisce una consistenza e stabilità maggiore grazie alle maglie della fibrina che permettono di arrestare completamente la fuoriuscita di sangue ma che non può comunque essere duraturo nel tempo.

FASE FIBRINOLITICA

Nella fase fibrinolitica il sistema della fibrinolisi, scioglie il coagulo di fibrina per mezzo della plasmina. La plasmina deriva dal plasminogeno ed è un enzima appartenente alla classe delle idrolasi che degrada molte proteine del plasma sanguigno, e in particolare la **fibrina**. Il plasminogeno viene attivato e trasformato in plasmina dal fattore XIIa. La sua attivazione porta allo scioglimento del tappo prima che questo possa staccarsi e iniziare a girare all'interno del circolo sanguigno con la possibilità di ostruire capillari andando a causare infarti o ictus. Inoltre questo processo avviene di pari passo con lo scioglimento dell'occlusione ripristinando totalmente il tessuto lesionato.

Ogni volta che prendiamo in esame tutti i componenti della fase emocoagulativa-fibrinolitica possiamo riconoscere una serie di punti critici. Questi corrispondono alle fasi critiche della cascata coagulativa come, ad esempio, la capacità da parte dell'endotelio di attivare le piastrine: se è presente un'attività anticoagulante o con una regolazione piastrinica alterata, a monte avremo un processo che non ha una fase vasale corretta e di conseguenza tutto il processo potrà mostrare delle problematiche

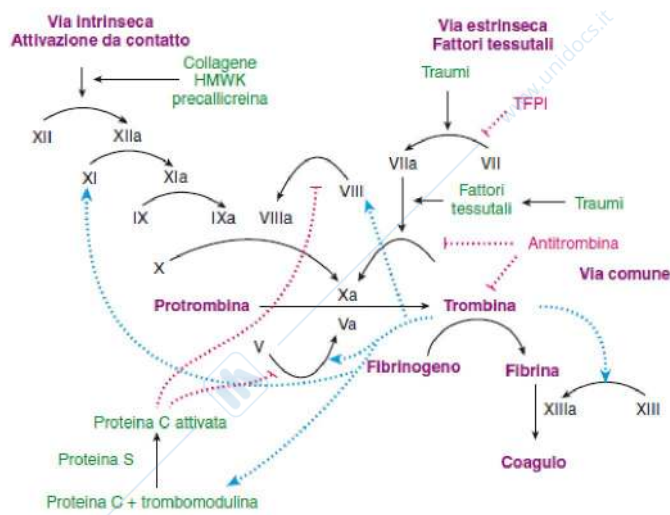
Componenti del sistema emocoagulativo

Endotelio	Attività Anticoagulante (TM, Proteoglicani, Sistema Proteina C e Proteina S, TFPI) Sistema Fibrinolitico (t-PA) Regolazione Attivazione Piastrinica
Piastrine	Struttura (Glicocalice-Membrana, Microtubuli, Granuli, Mitochondri) Funzione (Adesione, Modificazione conformazionale, Aggregazione, Secrezione)
Coagulazione	Fattori e Regolatori Trombina Inibitori (ATIII, Proteina C e Proteina S, HCII, alfa-2M)
Fibrinolisi	Fattori e Regolatori Plasmina Inibitori (TAFI, alfa-2AP)

Se ognuno di questi punti critici mostra un'alterazione è già indicativo di un possibile processo patologico che sia emofilico, in cui manchi un fattore necessario alla coagulazione, o trombotico, nel caso in cui manchi un fattore legato alla dissoluzione del coagulo. Nel processo di coagulazione è molto importante il bilanciamento tra la via emofilica e la via trombotica perchè in caso di eccesso di uno o dell'altro potrebbero condurre a gravi danni all'organismo.

Per tenere a mente tutto il meccanismo di coagulazione è stato elaborato un algoritmo che schematicamente permette di comprendere tutti i nomi dei fattori e le cose fondamentali. I due estremi del sistema sono la lesione iniziale del vaso e il processo di coagulazione.

Per quanto riguarda la lesione del vaso bisogna tenere presente che in base alla natura della lesione, endogena (per un aumento pressorio) o esogena (trauma), la reazione coagulativa non è la stessa in ambe due i casi. Una lesione di tipo endogeno porta all'attivazione della via intrinseca mentre una lesione di tipo esogeno porta all'attivazione della via estrinseca.



Oltre all'agente iniziale che le attiva, le due vie differiscono anche per il numero di fattori coinvolti nella cascata. La via intrinseca e la via estrinseca ad un certo punto però si congiungono, originando la via comune, che ha inizio con l'attivazione del fattore X (che trasforma la protrombina in trombina).

La via estrinseca è più rapida per il minor numero di fattori che vi prendono parte, viene attivata quando una lesione di un vaso sanguigno produce la liberazione dalle cellule danneggiate di fosfolipidi e di un complesso proteico detto fattore tissutale (o tromboplastina tissutale). I fattori attivati, oltre il fattore tissutale, sono i fattori plasmatici VII, X e V.

La via intrinseca è più lenta, perché comprende, oltre i tre fattori dell'altra via, anche i fattori XII, XI, IX e VIII, tutti fattori plasmatici. Questa via è innescata dall'attivazione del fattore XII, o fattore di Hageman, la quale si verifica quando il sangue entra a contatto con la matrice extracellulare, in particolare con le macromolecole di collagene. Ovviamente una lesione tissutale attiva entrambe le vie della coagulazione; infatti, la lesione non solo determina la liberazione della tromboplastina tissutale, ma anche, danneggiando i vasi sanguigni, consente al sangue di venire a contatto con superfici diverse da quelle endoteliali. La coagulazione per sola via intrinseca può verificarsi in condizioni patologiche, all'interno di vasi la cui superficie endoteliale sia danneggiata. La via estrinseca, pur avendo il vantaggio di essere veloce, da sola non porta alla formazione di un coagulo stabile se non viene rafforzata dall'attivazione della via intrinseca. Il contributo fondamentale di questa via è dimostrato dal fatto che, se essa non può avvenire per l'assenza di uno dei suoi fattori plasmatici, si manifestano gravi malattie emorragiche, note come emofilie.

Esistono inoltre delle molecole che hanno la capacità di regolare la formazione del trombo. La trombina, ad esempio, responsabile della formazione del coagulo è regolata da un sistema fisiologico che prende il nome di antitrombina III. L'antitrombina III è una glicoproteina sintetizzata dal fegato e dalle cellule endoteliali che viene attivata dall'eparina e va a bloccare l'effetto della trombina nel sistema coagulativo.

Ogni organismo in base al bilancio e alla necessità è in grado di avere un innesco e un potenziamento della fase coagulativa o un blocco della trombina in eccessiva condizione di coagulo. Questo bilanciamento è sempre finemente regolato fisiologicamente e al suo interno sono coinvolti una miriade di fattori. Ovviamente anche quando noi andiamo ad osservare il sistema inibitorio ritroviamo fattori critici attraverso i quali il nostro organismo non da vita a condizioni spontanee di ipercoagulamento.

Il controllo della coagulazione è deputato a varie sostanze presenti nel flusso sanguigno, le principali sono:

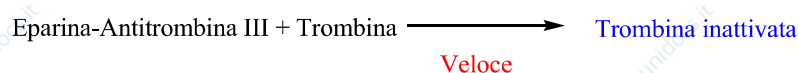
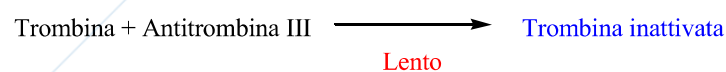
- Antitrombina III: è il principale inibitore fisiologico delle proteasi seriniche generate durante l'attivazione del sistema coagulativo. Essa inattiva la trombina e i fattori Xa, IXa, XIa, XIIa, questa inattivazione è accelerata notevolmente dall'eparina.
- Proteine C: è una glicoproteina plasmatica che, nella sua forma attiva, inattiva i fattori Va e VIIIa
- Proteina S: è il cofattore della proteina C, essenziale alla sua azione anticoagulante.

Fattori cruciali grazie ai quali il nostro organismo riesce a far fronte ad eccessi di coagulazione.

L'antitrombina III è una molecola proteica che circola libera nel plasma e perciò ogni volta che si effettua un dosaggio del sangue riusciamo ad osservare il livelli di antitrombina di un paziente. L'antitrombina ha una capacità di legame con altre molecole: essa infatti presenta cariche positive che si legano molto facilmente e efficacemente con le cariche negative dei glicosamminoglicani, eparina e l'eparan solfato.

L'antitrombina può agire in due modi:

- Bloccando il fattore X attraverso il legame eparina-antitrombina, che porta al blocco della produzione di trombina. Bloccando la formazione della trombina non si ha la formazione del coagulo perché la fase più critica è la via comune, ovvero la via che trasforma (a prescindere dallo stimolo) la protrombina in trombina grazie al fattore Xa.
- Bloccando direttamente la trombina, bloccando l'intero processo coagulativo.



L'eparina è quindi un anticoagulante o in maniera diretta o in maniera indiretta. L'eparina è un glicosamminoglicano che circola nel sangue. Tra i glicosamminoglicani abbiamo anche altre forme di molecole:

l'eparan solfato, dermatan solfato, cheratan solfato, condroitin solfato. Sono tutti glicosamminoglicani con carica negativa e che quindi si possono legare all'antitrombina inibendo il processo di coagulazione. Il più potente è l'eparina ma tutti i glicosamminoglicani con carica negativa hanno questa azione anticoagulante spiccata.

Anche la proteina S e la proteina C sono dei parametri da valutare in laboratorio perché attivano un sistema che va ad agire sulla formazione della trombina stessa. La presenza di proteina C e proteina S posso attivare una molecola proteica presente sulle cellule endoteliali che prende il nome di trombomodulina. La trombomodulina è in grado di modulare la creazione di un trombo. Avere un sistema tra proteina C e proteina S che legandosi tra di loro attivano il sistema della trombina con la trombomodulina potenzia la cascata coagulativa. La trombina infatti è in grado di stimolare il legame proteina C ed S che stimola a sua volta la produzione di fattore X. Questo sistema quindi accelera il fenomeno coagulativo.

In presenza di farmaci o sistemi che limitano la regolazione di proteina C con la proteina S la conseguenza è la limitazione della cascata coagulativa. L'aspirina ed il warfarin, ad esempio, sono farmaci che hanno un effetto anticoagulante perché vanno a limitare la trombomodulina ed il sistema con cui si potenzia la cascata coagulativa. Questo permette di riconoscere attraverso punti critici diversi (o della trombina o del sistema antitrombina o della trombomodulina) il modo per poter regolare in eccesso o in difetto l'innescò del coagulo stesso.

L'ultimo step è quello della fibrinolisi ovvero quello della dissoluzione del trombo.

È una fase particolarmente delicata e importante perché avvengono due processi in contemporanea:

- La produzione di cellule epiteliali
- Lo scioglimento del trombo rosso

La produzione di cellule epiteliali è stimolata dalla secrezione del fattore di crescita: tutto l'evento della cascata coagulativa è avvenuto in seguito ad una lesione dell'endotelio che deve essere dunque ripristinato completamente e quindi devono essere fatte ricrescere le cellule endoteliali, le muscolari e una parte di matrice. Il trombo non fa altro che chiudere la lesione del vaso cioè evitare che il sangue fuoriesca dal vaso ma la lesione rimane aperta. Tanto più complesso è il sistema quanto più grande è la lesione: una micro lesione in cui poche cellule sono coinvolte può essere facilmente ripristinata attraverso un fenomeno di ripristino della attività cellulare. Nel caso in cui invece il sistema è soggetto ad una lesione molto più ampia (dissezione di una grossa arteria) il sistema di ricostruzione è molto più lento e necessita di maggiori fattori di crescita per creare proliferazione del tessuto e ripristino del vaso. La produzione di cellule e lo scioglimento del trombo devono essere in stretto bilanciamento e il meccanismo con cui il bilanciamento viene mantenuto si basa su proteasi con un duplice effetto. Il vero e proprio sistema fibrinolitico del trombo diventa importante perché tutto il coagulo nasce intorno alla rete tridimensionale della fibrina assemblata. La fibrina nasce dalla degradazione proteolitica del fibrinogeno che è una sostanza zimogenica inattiva che circola nel sangue. La fibrina ottenuta poi forma un polimero attraverso il fenomeno della polimerizzazione di frammenti che hanno pesi molecolari diversi. Sono proprio i pesi molecolari diversi che permettono ai frammenti di essere collegati tra di loro per creare una rete tridimensionale in grado di intrappolare tutte le forme cellulari.

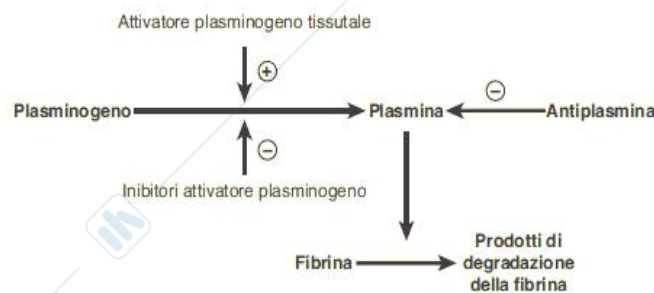
La fibrina nella fase iniziale, cioè la fibrina che nasce dalla attivazione del fibrinogeno, è in una soluzione solubile ed è una proteina attiva ma che ancora non è in grado di creare il coagulo. Man mano che procede la formazione del polimero tridimensionale, la soluzione da solubile diventa insolubile, precipita e forma la maglia.

Bisogna ricordare che tutti i frammenti proteici sono ovviamente soggetti al riconoscimento di siti di taglio di proteasi. Una delle molecole più attive nel regolare il taglio del polimero della fibrina si chiama plasmina. La plasmina è una proteasi serinica che nasce, come tutti gli altri fattori del sangue, da un zimogeno circolante che in questo caso prende il nome di plasminogeno. Il plasminogeno viene attivato solo quando c'è un reperto coagulativo in atto e viene regolato da due sistemi: uno che lo regola in eccesso e uno in difetto. Esiste quindi qualcosa che è in grado di stimolare la trasformazione del plasminogeno in plasmina e qualcosa in grado di bloccare questa trasformazione. Ci troviamo sempre in una condizione di bilanciamento finemente regolato.

Gli attivatori del plasminogeno si chiamano **u-PA** (attivatore del plasminogeno urochinasi dipendente) e **t-PA** (attivatore del plasminogeno tissutale). Queste due molecole sono in grado di attivare il plasminogeno e stimolare la sua trasformazione in plasmina. La plasmina è un enzima proteolitico forte in grado di tagliare i frammenti della fibrina e liberare di nuovo frammenti a basso o ad alto peso molecolare. Uno dei frammenti ad alto peso molecolare della fibrina è il d-dimero. Dosare questo frammento in laboratorio e ritrovarlo in una concentrazione elevata ci dice che nel paziente è avvenuto un coagulo che è stato tagliato dalla plasmina. Diventa perciò un marcatore di una pregressa coagulazione. Valori alti potrebbero significare anche che il paziente ha una propensione alla trombosi perché ha un sistema che taglia tanta fibrina.

Ovviamente esiste anche una serie di fattori che limitano la produzione di plasmina. Questi fattori sono gli **inibitori dell'attivatore del plasminogeno (PAI)**. I PAI sono gli inibitori fisiologici della plasmina. Il fattore plasminico è importante perché la plasmina è quella che regola il mantenimento del coagulo o la sua fibrinolisi. Se si mantiene integra la fibrina si ha un fenomeno trombotico (trombofilia) ma un eccesso di plasmina porta ad una dissoluzione troppo elevata del trombo con conseguente fenomeno di emofilia.

Quella che viene definita "via comune" tra la via intrinseca e la via estrinseca è rappresentata dalla trombina perché nasce sia in caso di aggregazione piastrinica sia in caso di riparo del tessuto. La trombina può produrre la trasformazione del fibrinogeno in fibrina, del plasminogeno in plasmina o il legame tra la proteina C ed S. La trombina diventa dunque il nucleo centrale del sistema in quanto controlla quale dei meccanismi mettere in atto.



Il dosaggio della protrombina perciò in laboratorio risulta essere di fondamentale importanza in quanto diventa una misura della via estrinseca della coagulazione. Questo test, che prende il nome di tempo di protrombina (PT), viene utilizzato per determinare la tendenza alla coagulazione del sangue, per adeguare il dosaggio del warfarin, per meglio determinare la gravità di una epatopatia e lo stato della vitamina K. Il PT misura i fattori della coagulazione I, II, V, VII e X. e viene utilizzato in combinazione con la determinazione del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT), che misura la via intrinseca della coagulazione. Il test PTT viene inoltre utilizzato per monitorare l'effetto dell'eparina sul sistema di coagulazione di un paziente.

Di fondamentale importanza è la presenza del calcio in tutti i fenomeni in cui devo avere un sistema che permette alle piastrine di creare il trombo bianco. Quando si utilizza come anticoagulante l'EDTA, che è un chelante del calcio, questo agisce bloccando il sistema della coagulazione: sia in caso di aggregazione piastrinica sia in caso di lesione da danno se viene rimosso il calcio non avviene l'aggregazione piastrinica e di conseguenza non avviene la formazione del trombo bianco. Un plasma privo di calcio non permette l'aggregazione dei fattori piastrinici e la conseguente attivazione dei fattori successivi.

Anche la trasformazione della protrombina in trombina è calcio dipendente. Più calcio viene rimosso meno possibilità di coagulazione ci sono.

COAGULOPATIE

Un campo fuori dalla fisiologia è indicativo di una patologia coagulativa (coagulopatia) ovvero di una condizione in cui la capacità del sangue di coagulare (forma di coaguli) è compromessa. Questa condizione può provocare una tendenza verso il sanguinamento prolungato o eccessivo, che può verificarsi spontaneamente o in seguito ad una causa esterna (infortunio o procedure mediche e dentarie).

Una coagulopatia può causare sanguinamenti interni o esterni incontrollati. Il sanguinamento non trattato e non

controllato può causare danni alle articolazioni, ai muscoli o agli organi interni e può essere pericoloso per la vita. Le coagulopatie sono classificate in tre gruppi a seconda che siano coinvolti il sistema vascolare (nella fattispecie, la parete dei vasi), le piastrine oppure i fattori della coagulazione.

Le coagulopatie da difetto vascolare di regola non sono gravi e si manifestano con petecchie, ecchimosi, sanguinamenti cutanei o delle mucose che si arrestano spontaneamente e non tendono a recidivare.

Le coagulopatie da difetto piastrinico, invece, possono essere causate da difetti qualitativi (piastrinopatie) o quantitativi (piastrinopenie se il numero è diminuito o trombocitosi se il numero è aumentato), che determinano in ogni caso una diminuita capacità di formare il tappo piastrinico. Le cause principali di piastrinopenie includono la ridotta produzione per insufficienza midollare o l'aumentata distruzione da farmaci o da una reazione autoimmune. Le piastrinopatie, a differenza delle precedenti, danno un conteggio piastrinico normale, ma le piastrine sono alterate nelle loro funzioni. Le cause principali possono essere individuate in farmaci, uremia, cirrosi, malattie autoimmuni o disordini mieloproliferativi. Le manifestazioni emorragiche di questo gruppo di malattie sono caratterizzate da porpora, in particolare ad avambracci, gambe, cosce, e sanguinamenti mucosi e viscerali, a volte anche gravi.

Le malattie autoimmuni sono malattie che inducono il proprio sistema immunologico a riconoscere come non-self una parte dell'organismo. Questo crea la condizione di limitare la funzionalità di alcuni organi.

La trombocitosi è molto spesso legata ad una malattia mieloide ovvero ad una forma leucemica: nel midollo sono presenti delle forme cellulari che vengono stimulate alla proliferazione seguendo più vie leucoproliferative e quindi anche la via che porta alla produzione dei megacariociti (che tramutano in piastrine con una conseguente maggiore propensione ad avere trombi). La trombosi poi genera ed è soggetta ad altri fenomeni di controllo come ad esempio l'aumento di proteina C, proteina S e di trombosmodulina. Esistono anche malattie che dipendono dalla carenza di questi "fattori di controllo": una bassa concentrazione di proteina C ed S blocca il sistema trombotico favorendo però le emorragie. Diventa importante tenere presente il fenomeno delle piastrinopenie perché un soggetto che acquisisce una terapia antibiotica che causa questa condizione deve essere monitorato per la sua attività emocoagulativa.

Diverso è invece il quadro clinico nelle coagulopatie da difetto dei fattori della coagulazione. In questi casi infatti si forma regolarmente il tappo emostatico, ma esso non viene consolidato dal reticolo di fibrina. Si avranno così emorragie persistenti e recidivanti a carico dei vasi di grosso calibro, con voluminosi ematomi intraarticolari e intramuscolari ed ecchimosi solitarie e molto estese.

Le cause delle coagulopatie possono essere quindi di natura qualitativa se si ha la giusta quantità della sostanza tenuta in osservazione ma che presentano una funzione aberrante o di natura quantitativa se invece si ha un numero ridotto della sostanza. Ad esempio: avere poche piastrine o averne un numero giusto non funzionante porta in entrambi i casi a un difetto della coagulazione ma con due meccanismi totalmente diversi e con due approcci terapeutici totalmente diversi.

Oltre alla classificazione delle coagulopatie in base alle cause, è possibile distinguere le coagulopatie in:

- Congenite, se sono presenti fin dalla nascita.
- Acquisite

Le coagulopatie sono legate ad una carenza di fattori della coagulazione o della fibrinolisi e generano un sistema che va incontro ad una mancata coagulazione perché non sono presenti nelle giuste concentrazioni. Questa situazione di deficit dei fattori otterrà come risultato una non corretta coagulazione e una non chiusura del vaso danneggiato perché lo stimolo è adeguato ma non sufficiente. Tipiche delle coagulopatie congenite sono le varie forme di emofilia - da deficit dei fattori VIII, IX e XI - e la sindrome di von Willebrand. Tra le coagulopatie acquisite invece ritroviamo i deficit da carenza di vitamina K, da epatopatie croniche, da CID (coagulazione intravascolare disseminata), da deficit di fibrinogeno,

La diagnosi di una qualunque malattia emorragica prevede dapprima un accurato esame clinico del paziente, con anamnesi familiare e personale ed esame obiettivo, poi l'impiego di appropriate tecniche di laboratorio e di

diagnostica clinica: le più comunemente impiegate sono la prova del laccio, il tempo di emorragia, il conteggio delle piastrine, il tempo di tromboplastina parziale (PTT), il tempo di protrombina (AP o PT), la misurazione del tasso dei singoli fattori della coagulazione.

Ogni test effettuato ha un significato specifico. Tutti i fattori possono essere dosati e quindi le analisi vengono divise in:

- Analisi di prima istanza
- Analisi di seconda istanza

Tra le analisi di prima istanza ritroviamo le analisi più frequenti e che sono indispensabile per inquadrare una patologia emocoagulativa e fibrinolitica. Si hanno dei parametri di riferimento con i quali confrontare le analisi ottenute e in caso di risultato "border line" vengono effettuate le analisi di seconda istanza.

Test di I e II istanza per la valutazione del sistema emostatico

	Test di prima istanza	Test di seconda istanza
Coagulazione	PT, aPTT	ATIII, HC II, Proteina C/S
	Fibrinogeno, FDP	Fatt. V Leiden, Fibrinopeptide A, Complesso Trombina-Antitrombina
Piastrine	Numero, Adesione	Fatt. Piastrinico 4, Tromboglobulina, TxA ₂
	Aggregazione	PGF1alfa, PGH ₂ , PAF
Fibrinolisi	Lisi Euglobuline	Plasminogeno, Antiplasmina
Endotelio		Attivatore Tissutale Plasminogeno, PAI, D-dimero, Prodotti degradazione Fibrina, prodotti degradazione Fibrinogeno VWF, TPA, PAI, IL-8, IL-6

I risultati delle analisi, paragonati ai parametri di riferimento e alle manifestazioni che presenta il paziente, permettono di risalire al disordine emostatico

Allungamento Tempo di Tromboplastina Parziale (aPTT)	Senza Emorragia: Fattori XII, Chininogeno, Precallicreina
	Emorragia lieve: Fattore XI
	Emorragia grave o frequente: Fattore VIII, Fatt. IX e VWF
Allungamento Tempo di Protrombina (PT)	Deficit Fattore VII
	Deficit iniziale di Vitamina K
	Terapia con anticoagulante
Allungamento aPTT e PT	Deficit di fattori II, V o X e fibrinogeno
	Deficit di Vitamina K
	Terapia con anticoagulante orale ed eparinica
Allungamento Tempo di Trombina (TT)	Emorragia lieve o rara: afibrinogenemia
	Emorragia grave e frequente: disfibrinogenemia
	Somministrazione di Eparina
Solubilità Coagulo in Urea 5M	Deficit di Fatt. XIII
	Deficit di Cross-linking
Lisi Rapida Coagulo	Inibitore della alfa-2 plasmina

LEZIONE 8

Lo **stress ossidativo** è un argomento molto attuale ed in pochi ne conoscono i dettagli. Lo stress ossidativo è molto importante, in quanto, come tutte le cose che riguardano il nostro organismo è soggetto ad un preciso bilanciamento. L'omeostasi nel corpo è sempre l'obiettivo finale.

In tutti i tessuti ed organi è presente lo stress ossidativo, infatti questi producono spontaneamente **radicali liberi**. In alcuni casi, in altri no, sono prodotti fisiologicamente da forme di catabolismo del nostro organismo, dovuto sia in risposta a stimoli sia per normale metabolismo. Se le soglie di concentrazione dei radicali superano le difese endogene del nostro organismo, allora si entra in una fase di stress.

L'organismo, così come è in grado di produrre questi radicale è anche in grado di produrre sostanze antiossidanti come meccanismo di difesa (prodotte esclusivamente in maniera endogena, senza quindi poter fare integrazione). Il normale bilanciamento che si ottiene tramite la produzione di radicali e la capacità del nostro organismo di avere difese antiossidanti porta ad avere un bilanciamento omeostatico. Un eccesso di radicali, o una diminuzione delle difese antiossidanti, comporta uno stress ossidativo. Questo se presente in fase acuta potrà essere riscontrato

tramite un fenomeno infiammatorio, se invece è cronico crea una disfunzione del tessuto di alcuni organi portando così alla cronicità di alcune patologie.

Il radicale libero, da un punto di vista prettamente chimico, si ha quando un atomo che non possiede l'ottetto (quindi non stabile) avrà la propensione nel cedere o acquistare un elettrone, esempio: l'atomo di ossigeno non possiede una nuvola elettronica completa ed ha dunque la capacità di prendere due elettroni per raggiungere la stabilità, quindi risulterà essere fortemente reattivo. Ogni volta che questo atomo cederà o acquisterà un elettrone, va incontro ad un fenomeno di forte instabilità. Nel caso l'ossigeno acquisti un solo elettrone questo formerà OH^\cdot , uno dei radicali più fortemente reattivi perché resterà altamente instabile e cercherà qualsiasi componente (organica o inorganica) a cui sottrarre un elettrone per raggiungere la stabilità. Elementi di questo genere (ossigeno in fase attiva, OH^\cdot , l'atomo di ossigeno che perde un ulteriore elettrone) mostrano una forte reattività da un punto di vista chimico e sono dunque in grado di ossidare altre specie chimiche.

Alcune sostanze organiche, dopo esser state ossidate, cambiano la loro struttura perdendo così la propria funzionalità (esempio: lipidi e proteine). Ogni qualvolta nel nostro organismo avremo una componente che si ossida, ne avremo un'altra che si riduce. Questo implica che è presente un regolamento con il successivo bilanciamento della sostanza che capta elettroni e della sostanza che cede elettroni. La componente ossidata perderà la sua capacità funzionale e quella che si riduce tende a riacquistarla.

Questo meccanismo comporta un fenomeno a cascata: colui che ossida deve avere un riducente, che a sua volta tenderà nuovamente ad ossidarsi, innescando la cascata di ossido-riduzione in funzione di un successivo bilanciamento. Per questo motivo l'organismo è in grado di produrre radicali ossidanti e sostanze anti-riducenti (vengono prodotte in maniera biochimica all'interno del nostro organismo).

Le specie radicaliche sono differenti in base all'elemento di provenienza: ossigeno, azoto, carbonio (quindi a base di sostanze organiche). Tutti questi radicali presentano funzionalità e capacità antiossidanti diverse, infatti alcune risultano meno reattive (perossido di idrogeno). Lo studio dei radicali si ha grazie a degli esperimenti effettuati su bambini con complicazioni respiratorie post nascita, che posti in condizioni di iperossia generava su questi ultimi fenotipi patologici gravi come ad esempio la lesione dell'alveolo polmonare dovuta ad un eccesso di quantità di ossigeno prolungata nel tempo (questo ci fa capire che esiste un dato bilanciamento dell'ossigeno). Un'elevata quantità di ossigeno puro può causare ingenti danni in svariati tessuti. Esempio: fibroplasia cardio-ventricolare, in cui si ha la trasformazione della componente del cristallino in componente fibrotica. Il danno però non era arrecato dall'ossigeno, bensì dalla sua capacità di scindersi nelle suddette specie reattive RSO (Reactive Species of Oxygen).

In opportune condizioni metaboliche l'ossigeno presenta differenti specie reattive che possono crearsi durante vari processi fisiologici, ad esempio: nella fagocitosi un macrofago, che si è trasformato in monocita, entra in contatto con l'agente esterno e crea così la fagocitosi innescando all'interno del macrofago delle reazioni di distribuzione delle componenti batteriche tramite enzimi e strutture presenti in zone specifiche definite perossisomi. Tra i vari tipi di perossisomi ne esistono alcuni che sfruttano l'ossigeno, creando radicali che devono essere mantenuti dentro determinate componenti per poi essere degradati in maniera non nociva.

A seconda delle modalità di perdita di uno o più elettroni da parte dell'ossigeno possiamo avere più tipi di forme reattive: monossido, perossido, perossile, ossidrilico e superossido. È importante distinguere le specie radicaliche (superossido, ossidrilico e perossile) dalle specie non radicaliche come l'ossigeno singoletto, l'ozono ed il perossido di idrogeno, in quanto ci permette di capire le varie reazioni da quest'ultimi generate. Le non radicaliche avranno prima bisogno di scomporsi per poi diventare reattive, mentre le radicaliche agiscono istintivamente e direttamente sulle varie componenti organiche del nostro organismo. Le specie non radicaliche, per diventare reattive, hanno bisogno di reazioni chimico-fisiche (questo avviene tramite eterolisi). Quando lo stesso tipo di composto va incontro a fenomeni di omolisi, questo comporta che gli ioni generati possiederanno dei radicali della stessa specie, possedendo entrambi un elettrone instabile ed altamente reattivo. Le altre reazioni generate dallo stesso ossidativo alle macromolecole organiche (proteine e lipidi) risultano essere irreversibili e rimangono quindi nel tempo.

I vari meccanismi che innescano l'omolisi sono:

- **Fotolisi** dovuta ad esposizione a raggi ultravioletti.
- **Termolisi** dovuta ad un innalzamento della temperatura corporea (<39 °C)
- Presenza di **metalli di transizione**: fortemente reattivi in quanto funzionano da innesco, non vanno incontro a trasformazione prendendo e successivamente cedendo l'elettrone acquistato (favoriscono le reazioni di scambio elettronico).

La sola presenza di questi metalli induce uno stress ossidativo: durante la formazione dei ROS il ferro riveste un ruolo fondamentale, maggiore sarà la concentrazione di ferro, maggiore sarà la velocità di queste specie reattive. Ogni qualvolta nel nostro organismo abbiamo molecole che contengono ferro (ferritina, transferrina, emoglobina eritrocitaria), in presenza di acqua ossigenata, danno origine a delle reazioni che portano alla formazione di ioni radicali liberi dell'ossigeno. Qualsiasi molecola contenente ferro, indistintamente dalla sua funzione, può essere oggetto di trasformazione in presenza di perossido di idrogeno (prodotto in maniera endogena dal nostro organismo), Questo fenomeno, in elevata presenza di ferro, può generare gravi danni tissutali. Le condizioni e gli steps in cui vengono prodotti sono differenti e sono suddivisi in: inizio, propagazione e fine.

Con formazione della catena di reazioni la propagazione permette l'ossidazione di più molecole e differenti fra loro: un lipide può ossidare una proteina come anche molecole di DNA. La propagazione genera ulteriori radicali, una catena lunga che presenta un lipide può andare incontro ad ossidazione del lipide, frammentandosi e formando due catene più corte fortemente reattive.

Le cause che possono generare radicali possono essere esogene od endogene. Le risorse endogene includono i mitocondri, il metabolismo del citocromo P450, i perossisomi e l'attivazione delle cellule infiammatorie. Le cellule con capacità fagocitarie (neutrofilo, macrofago, ecc) possiedono la capacità di ossidazione respiratoria, ovvero la capacità durante la fase respiratoria e in presenza di ossigeno di bloccare qualsiasi componente esterna. Gli enzimi microsomiali, come ad esempio il citocromo p450, sono in grado di limitare i danni ossidativi e rappresentano una delle difese più importanti a livello mitocondriale (utilizzato per detossificazione di farmaci ed agenti esterni), tuttavia il mancato funzionamento del ciclo catalitico del citocromo P450 incrementa la possibilità di generare ROS. Lo stress emotivo può indurre un malfunzionamento delle secrezioni ormonali; il sistema ormonale essendo soggetto ad un ferreo bilanciamento e controllo se alterato stravolge tutto il metabolismo (soprattutto mitocondriale, lipidico e glucidico).

Tra le cause esogene invece ritroviamo i metalli (ridotti e non ridotti), ioni, radiazioni (UV, raggi gamma, raggi X), farmaci (barbiturici), contaminanti ambientali e agenti cancerogeni. Tra i metalli pesanti ricordiamo soprattutto metalli come rame, piombo e amianto. In particolare quest'ultimo è il più nocivo in quanto genera gravi danni al DNA sia dell'individuo sia alla progenie (tendono a generare neoplasie nell'arco di 25 anni dopo il contatto con l'amianto).

Le due più importanti vie endogene sono: la respirazione cellulare e la respirazione mitocondriale (intramitocondriale). Quando nel mitocondrio si verifica un aumento di radicali, si verifica una perdita funzionale e la successiva morte mitocondriale.

I perossisomi sono degli organuli di fondamentale importanza in quanto presentano una componente enzimatica, che in caso di formazione di radicali liberi, trasforma la componente reattiva in componente non reattiva. Ad esempio, un superossido viene degradato dall'enzima superossido dismutasi (SOD), enzima situato all'interno dei fagociti, che porta alla formazione di acqua ossigenata. Delle componenti cellulari del midollo è importante ricordare l'enzima mielo perossidasi che trasforma la componente di perossido in un radicale clorurato, meno tossico, reattivo e più facilmente degradato dall'organismo. Il perossido, in presenza di ferro, può legarsi e creare ingenti danni. Per prevenire ciò nel nostro organismo è presente un enzima chiamato catalasi che trasforma il perossido in acqua e ossigeno. Se il danno avviene nel citosol, sono presenti sia elementi mitocondriali sia potranno intervenire i perossisomi in modo da avere le risposte più efficaci. Nel citoplasma delle cellule si accumulano le sostanze ossidanti che poi verranno indirizzate verso i mitocondri o verso i perossisomi.

L'organismo è dunque in grado di utilizzare e indirizzare verso la risposta più efficiente. Nel nostro organismo sono presenti diverse forme di citocromo differenziabili in **costitutivi** e **inducibili**, il citocromo p450 e la ciclossigenasi sono forme enzimatiche costitutive dei mitocondri (sintesi e catabolismo degli ormoni sia proteici sia steroidei avvengono tramite il citocromo p450). In particolari condizioni il citocromo p450 può essere indotto poiché serve una migliore difesa e detossificazione. In questo caso il citocromo p450 inducibile è presente nel REL. Il danno può avvenire ai lipidi, generalmente danneggiando i lipidi costituenti le membrana cellulari e degli organuli, oppure riguardare le proteine sia solubili sia non, ovvero istoniche/non istoniche presenti nel nucleo, o proteine legate a membrana.

Nel caso in cui queste strutture vengano ossidate si può avere un danno reversibile iniziale o irreversibile finale. In caso di danno reversibile saranno eliminate le molecole proteiche ossidate, quando invece il danno è irreversibile non potranno più essere eliminate dalla cellula stessa divenendo tossiche e accumulandosi, generando un danno alle cellule stesse.

Tutti questi sistemi portano ad avere il fenomeno necrotico perché si ha un attacco sui lipidi di membrana esterna che porta a lisi, infiammazione e degradazione delle componenti nucleari con conseguenti fenomeni apoptotici che a lungo termine porteranno alla necrosi da stress ossidativo. Questo genera il rilascio di tutte le componenti intracellulari all'esterno con conseguenti fenomeni di degradazione del tessuto bersaglio. La patologia che ne scaturisce può essere acuta, se gli effetti possono essere subito tamponanti da effetti anti-infiammatori e anti-ossidativi, o cronica se protratta nel tempo (come tutte le patologie a carico del sistema osteo-articolare, cerebrale ed ematico). I target sono le classi più comuni di macromolecole nell'organismo: lipidi, proteine, glucidi e acidi nucleici.

Per quanto riguarda i lipidi, la loro funzione può essere compromessa dalla presenza di perossidi in quanto questi ossidano la catena lipidica. In base alla lunghezza della catena avremo esiti differenti: più catene laterali con legami singoli che uniscono il carbonio oppure meno catene laterali con la presenza di doppi legami. Nei punti in cui sono presenti doppi o tripli legami sarà più facile che avvenga una perossidazione da sostanze esogene. Possiamo avere anche danni precoci oppure danni tardivi: nel 1° caso l'ossidazione forma addotti lipidici, nel 2° caso vengono formate le aldeidi ovvero prodotti di degradazione molto avanzata che generano molecole lipidiche di corta catena come l'MDA (malonil dialdeide).

In base al dosaggio dell'MDA potrò sapere se il danno da ossidazione lipidica è recente o meno. Questo genera una risposta diversa perché rilevando un marcatore precoce posso indicare una corretta alimentazione o un'integrazione alimentare con anti-ossidanti, se il danno è prolungato sarà a carico di più organi e quindi andranno cambiati più fattori.

Il bilanciamento di due classi di lipoproteine (LDL e HDL) risulta essere molto importante in quanto aiuta nella detossificazione: le LDL possono andare incontro ad una β -ossidazione che produrrà MDA se prolungata nel tempo oppure un radicale perossido che si accumula come sostanza tossica nelle membrane. Questo accumulo provoca una patologia che porta alla rigidità della membrana causando un ulteriore accumulo dei lipidi all'interno e generando le basi metaboliche della placca aterosclerotica.

Quando parliamo di aterosclerosi ci riferiamo ad un sistema costituito da due componenti: Una componente lipidica (un lipide alterato porta alla formazione della placca in quanto non degradabile perché non riconosciuto dalle lipasi) Macrofagi e meccanismi infiammatori che aiutano al deposito e formazione della placca. Dall'ossidazione delle molecole proteiche si ha la formazione del carbonile, dovuta all'ossidazione diretta su alcuni amminoacidi particolari (arginina, prolina, lisina e troinina) più sensibili ai radicali dell'ossigeno che cambiano la struttura e bloccano la sequenza primaria alterando tutta la funzionalità della molecola proteica stessa.

LEZIONE 9

L'attacco dei ROS (radicale idrossile) sugli acidi nucleici può causare mutazioni su specifiche basi e anche rottura della doppia elica.

Ogni volta che andiamo ad osservare un danno al DNA questo può essere riparato da sistemi di riparo del DNA. La scelta può essere o quella di degradare completamente il DNA o quella di tagliare solo il pezzo d'interesse per ricostruirlo de novo. Se la cellula decide non di fare apoptosi ma di porre rimedio al danno singolo quello che si viene a formare è un prodotto degradativo del DNA chiamato 8-OHdg (opto-oxoguanina). Questa molecola è un catabolita del riparo del DNA le cui concentrazioni elevate vogliono dire che il sistema riparativo del DNA è stato attivato in maniera consistente. Essendo la guanina un punto molto fragile nel ricevere stimoli da gruppi idrossilici diventa anche più facile formare la 8-OHdg che rappresenta un marcatore di danno al DNA che viene riparato. Quindi ogni volta che la guanina va in contro a un danno ossidativo riparato dal sistema possiamo identificarlo come 8-OHdg che ritroviamo e possiamo dosare nel plasma e nelle urine (dove è fisiologicamente assente). Ovviamente tanto più alti sono i valori di 8-OHdg tanto più grande è il danno al DNA.

I danni da stress ossidativo sul DNA non avvengono solo nel DNA nucleare ma anche nel DNA mitocondriale dove però non esistono fenomeni di riparo del DNA e perciò ogni volta che si ha uno stimolo ossidativo il mitocondrio fa fatica a riprendere il sistema.

Ogni stress ossidativo consiste in una reazione di ossidazione che porta alla produzione di radicali liberi. Questi sono responsabili della avvio delle reazioni a catena che mandano in apoptosi le cellule.

Per rimediare esiste un sistema ANTIOSSIDANTE che permette un recupero della attività. Questo sistema prevede l'intervento di una famiglia di sostanze definite appunto antiossidanti (o scavenger) che terminano queste reazioni a catena intervenendo sui radicali intermedi ed inibendo altre reazioni di ossidazione facendo ossidare se stessi. Un antiossidante funziona come una sostanza riducente creando una stabilità dell'anione.

La famiglia delle sostanze antiossidanti è molto vasta. Possono essere classificati in due grandi divisioni a seconda che siano solubili in acqua (idrofili) o nei lipidi (idrofobi). In generale, gli antiossidanti idrosolubili reagiscono con gli ossidanti nel citoplasma cellulare e nel plasma, mentre quelli liposolubili proteggono le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica.

La distribuzione all'interno della cellula degli antiossidanti dipende dalla loro solubilità. A seconda di come sono localizzate presentano una maggiore o minore attività di protezione di quella componente.

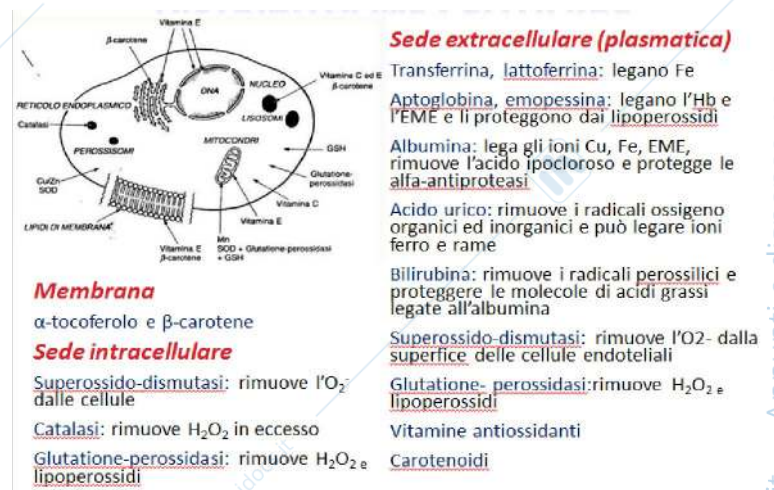
La classificazione principale però distingue queste sostanze in: enzimatiche e non enzimatiche. All'interno di queste due categorie esistono due mondi diversi di capacità di reazione: ad esempio tutto ciò che viene definito antiossidante su base enzimatica significa che l'attività di queste sostanze si basa sul riconoscimento di un substrato per annientare o limitare la reazione.

Gli antiossidanti enzimatici si dividono in enzimi primari (presenti in tutte le cellule) e secondari. Tra gli enzimi primari ritroviamo: **Superossido dismutasi, Catalasi e Glutazione perossidasi**.

Questi tre enzimi lavorano in sequenza e insieme servono per bloccare a monte tutto il generare le specie reattive dell'ossigeno.

La superossido dismutasi(SOD) è localizzata nei **mitocondri (Mn-dipendente)** e nel **citofosfo (Cu/Zn-dipendente)**. E' responsabile della difesa cellulare primaria contro l'anione superossido ($O_2\bullet$) convertendolo in perossido d'idrogeno $2O_2\bullet + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

La forma extracellulare (EC-SOD) rimuove $O_2\bullet$ dalla superficie delle cellule endoteliali.



La Glutazione perossidasi (GPx) presenta diverse localizzazioni (cellule, liquidi extracellulari, membrane cellulari) e diversi substrati (perossidi organici, idrogeno perossido). Richiede **selenio** (cofattore) e **glutazione** (riducente) e agisce convertendo GSH ridotto in GSH ossidato rimuovendo H_2O_2 :



La rigenerazione del GSH avviene ad opera della GSH-reduttasi NADPH-dipendente

La catalasi (CAT) è localizzata nei mitocondri, citosol e perossisomi (Fe-dipendente). E' responsabile della difesa cellulare primaria contro il perossido d'idrogeno H_2O_2 trasformandolo in acqua e O_2

Tra gli enzimi secondari invece ritroviamo la **glutazione reduttasi** (ristabilisce il glutazione) e la **G6PD**.

Ovviamente tutti e 5 gli enzimi insieme lavorano in maniera più efficace ma mentre i primi sono indispensabili per intervenire nella reazione di ossidazione, la mancanza degli ultimi due può essere sostituita da altri meccanismi.

Gli antiossidanti non enzimatici, a differenza di quelli enzimatici, non agiscono singolarmente ma in cooperazione e perciò devono essere presenti tutti nelle giuste quantità.

Tra gli antiossidanti non enzimatici ritroviamo: i polifenoli (fenoli, tannini e flavonoidi), i cofattori (coenzima Q10), minerali (zinco e selenio), composti organosolfurati (glutazione), acidi fenolici, vitamine, carotenoidi e composti azotati non proteici (acido urico).

I polifenoli sono distinti in 3 categorie: **fenoli, tannini e flavonoidi**.

I fenoli generano molto spesso una condensazione di loro stessi che genera appunto i polifenoli che presentano una proprietà di difesa intrinseca alla struttura. L'acido caffeico del caffè verde ha capacità di difesa nei confronti degli stress ossidativi, l'acido caffeico presente nel caffè tostato invece ha perso la struttura responsabile di questa capacità.

I tannini sono delle sostanze molto diffuse in natura ma che per creare una grossa difesa antiossidante devono essere idrolizzati (contrario dei fenoli).

I flavonoidi sono una famiglia di sostanze esogene che proteggono la cellula dall'insulto ossidativo primario. Esse sono capaci di rimuovere i perossidi, sono inibitori della perossidazione lipidica e possono chelare gli ioni metallici e prevenire così la rottura del perossido di idrogeno. La loro presenza all'interno della cellula è fondamentale: non appena la loro concentrazione diminuisce il target dei radicali diventa la cellula.

Tutti i polifenoli hanno un'azione nel metabolismo dello stress ossidativo attraverso il blocco delle vie di entrata. Quando è presente un sistema che va ad agire sulla membrana periferica ne consegue uno stress ossidativo che agisce principalmente sulle componenti di membrana generando l'aumento dei ROS, provocando una diminuzione della difesa e l'innescio di chinasi intracellulari. Le chinasi intracellulari fungono da secondi messaggeri che quindi espandono lo stimolo ossidativo dall'esterno all'interno della cellula. L'attivazione delle chinasi può creare le condizioni per cui viene indotta la trascrizione di alcuni cofattori per l'espressione di geni proinfiammatori (IL-1 β , IL-8, TNF α , iNOS).

I minerali, come lo zinco e il selenio, devono anch'essi essere integrati con la dieta e presentano un'attività antiossidante non particolarmente spiccata ma sono necessari in quanto la loro presenza aumenta l'attività degli antiossidanti enzimatici (agiscono in maniera indiretta).

I composti organosolfurati presentano al loro interno lo zolfo, presente sia sotto forma di S-S sia sotto forma di S-H. Questi composti vengono utilizzati per bilanciare il sistema ossidativo in quanto lo zolfo può funzionare sia da agente riducente sia da agente ossidante.

Tra questi composti ritroviamo il glutazione (GSH), un tripeptide composto da glutamil, cistetil e glicina. Questa struttura tripeptidica permette di avere sh libero agendo da cofattore per la GPx permettendole di svolgere il suo ruolo antiossidante.

Le vitamine e i carotenoidi sono facilmente introducibili tramite la dieta. Le tre vitamine che presentano attività antiossidante sono la vitamina A, C ed E

Se si prendono in esame vitamina C e vitamina E ci si trova davanti ad un paradosso sulla capacità di risposta ad uno stress ossidativo tra le due forme: queste due forme pur essendo distribuite in maniera diversa (avendo strutture diverse la loro distribuzione dipende dalla loro solubilità: la vitamina E è lipofila mentre la vitamina C è idrosolubile) se non è presente l'una o l'altra vitamina non si avrà la completa funzionalità delle due vitamine.

La vitamina C (acido ascorbico) funge scavenger nei confronti di vari radicali ($\text{HO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$ e O_2) ed inoltre interviene nella rigenerazione dell' α -tocoferolo (vit. E):



La rigenerazione di ascorbato ridotto avviene poi ad opera di una ascorbato reduttasi NADPH-dip.

La vitamina E (α -tocoferolo) interrompe la reazione a catena di lipoperossidazione rimuovendo l'atomo di H dal gruppo OH) ossidandosi ad α -tocoferossile, che migra sulla superficie della membrana e viene riconvertito ad α -tocoferolo dalla vitamina C.

Questi due cicli con l'aggiunta del ciclo dei tioli (ciclo del glutatione) diventa il miglior metodo di risposta ad un danno ossidativo.

I carotenoidi sono precursori della vitamina A e sono utili per generare accumuli di vitamine ad attività antiossidanti nell'organismo stesso. La vitamina A ha una capacità particolarmente spiccata nei confronti di forme ossidative legata a componenti esogeni (fumo, asbesto, alcol, ecc) in cui lo stress va a colpire la parte solubile di membrana. Il β -carotene forma una barriera in quanto ha proprietà antiossidanti nei confronti dei danni ossidativi del DNA.

Tutte le altre componenti sono citabili ma non di così elevata importanza: l'acido urico, ad esempio, è un chelante del ferro e del rame, quindi può intervenire nelle reazioni di ossidazioni ma non da un valore aggiunto alle altre sostanze.

LEZIONE 10

NETWORK PRO-OSSIDANTE

I punti comuni che si possono osservare andando a guardare il network pro-ossidante, ovvero a favore dell'ossidazione del microambiente cellulare, sono legati ai sistemi dei danni, quindi centrando l'attenzione sulle componenti radicaliche dell'ossigeno, quindi l'ossigeno singoletto, che rappresenta il maggiore disturbo ossidante perché è quello più instabile, da cui si può generare la componente del perossido di idrogeno che è sempre pro ossidante ma non radicalico.

A questo riguardo, quando focalizziamo l'attenzione sull'ossigeno singoletto (radicale dell'ossigeno), questo è in grado di creare danno in diverse macromolecole. Ogni volta che si osserva questo danno esiste sempre correlato un quadro infiammatorio. L'infiammazione può essere o in grado di generare il radicale dell'ossigeno, o il radicale dell'ossigeno è in grado di attivare il reperto infiammatorio e quindi di generare poi ulteriori danni correlati. Ciò comporta che l'ossigeno singoletto e tutte le specie radicaliche fortemente reattive sono in grado di generare un danno. Essi cercano una stabilizzazione molecolare. La stabilizzazione si può ottenere o generando un danno nelle altre molecole, o generando specie non radicaliche come il perossido di idrogeno.

Ogni volta che si ha la trasformazione di radicali in non radicali esistono delle molecole che guidano queste operazioni: la superossido dismutasi, per esempio, crea la dismutazione dell'anione superossido generando ossigeno legato a perossido. Il perossido se presente all'interno di un ambiente cellulare in cui il ferro è costantemente presente, è in grado di generare ulteriori forme radicaliche attraverso le specie reattive, attraverso le reazioni di Fenton. Queste comportano l'ossidazione proteica con prodotti reattivi.

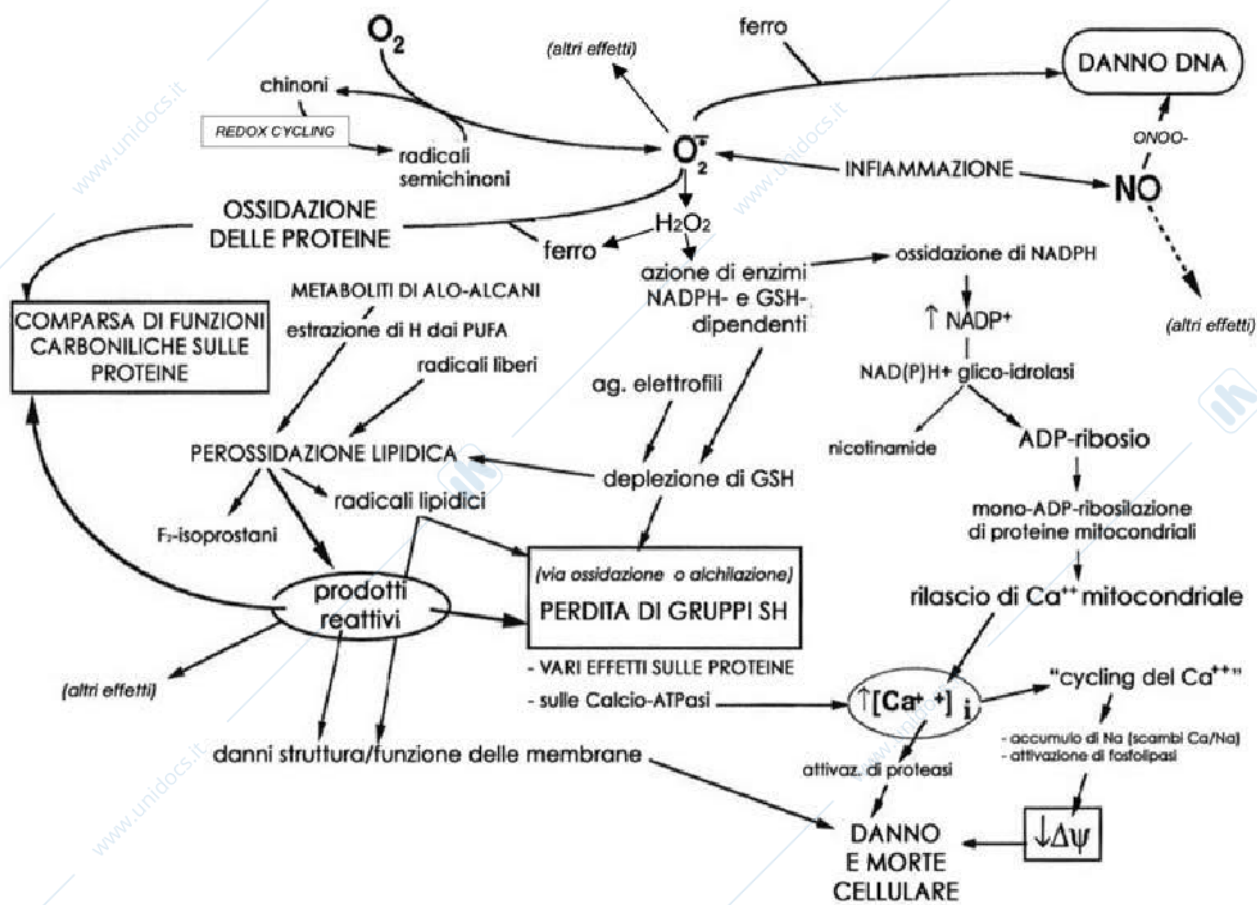
Se prendiamo in esame solo la parte ossidativa non stiamo osservando quali sono i fenomeni che creano il tampone di queste reazioni.

I prodotti reattivi non sono limitati solo all'ossidazione proteica, ma possono portare anche ad una perdita della capacità del gruppo S-H, il quale crea stabilizzazione proteica. Quindi queste proteine tendono a perdere il gruppo

SH, ad alterare la loro struttura tridimensionale, e questa perdita non viene supplementata dal glutatione. Quindi la proteina perde costantemente gruppi SH funzionali fino ad avere molecole che non sono più funzionalmente attive.

E' ovvio che tutte queste funzioni vanno ad interferire anche sulla possibilità di perdere la funzionalità del legame con il calcio; una deplezione del calcio provoca una deplezione di funzionalità mitocondriale e quindi porta all'attivazione dell'apoptosi mitocondriale.

Il radicale perossido è fortemente attivo anche nel radicale di tipo carbonilico, quindi tutto ciò che ha componente carboniosa viene ad essere intaccato formando radicali alchilici. Questi radicali si formano durante la perossidazione lipidica, la quale porta a delle conseguenze sulla membrana esterna, plasmatica, membrana di ogni organulo cellulare, creando dei radicali alchilici ma anche dei prodotti che possono andare ad alterare la funzionalità. Quindi avremo un'alterata funzionalità di tutti gli organuli che sono rivestiti di membrana (secrezione attiva, capacità di dirigere l'impulso nervoso ecc..).



Se si osserva, invece, come l'organismo fisiologicamente cerca di far fronte con un sistema anti-ossidante a tutto ciò che abbiamo appena detto, si scopre che i sistemi anti-ossidanti sono tra di loro strettamente in equilibrio e sono legati al sistema del glutatione. Il glutatione è una molecola che ha un ruolo fondamentale nell'equilibrio antiossidante. L'organismo una volta che ha avuto dei danni, viene omeostaticamente equilibrato dai nostri sistemi di difesa. Il primo è quello della superossido dismutasi: anione superossido, si forma una specie reattiva che è il perossido diidrogeno, che non è radicalico ed è meno ossidante dell'anione superossido del radicale idrossile.

Ogni volta che si ha questo sistema, l'organismo cerca, attraverso il sistema enzimatico, di porre un freno al sistema del danno, ovviamente, quindi, limitando il danno alle proteine, carboidrati, DNA e molecole lipidiche. Ogni volta che si avranno danni diversi, si avranno meccanismi di difesa diversi. Per esempio, il radicale ossidrilico è particolarmente attivo sulla parte carboniosa. Ogni volta che si hanno dei radicali di questo genere bisogna far fronte con un sistema che ripristina lo ione idrogeno che è stato tolto attraverso un fenomeno ossidativo dell'ossidrilico. L'OH per avere un sistema stabile deve perdere un elettrone e acquisire un H+ e quindi tamponare formando acqua. L'H lo può prendere da un acido grasso che da saturo può diventare insaturo, da polinsaturo può diventare perossinico e in questo caso può formare gli idroperossidi dei lipidi. Se tutto dovesse andare nel senso dell'ossidazione si potrebbe

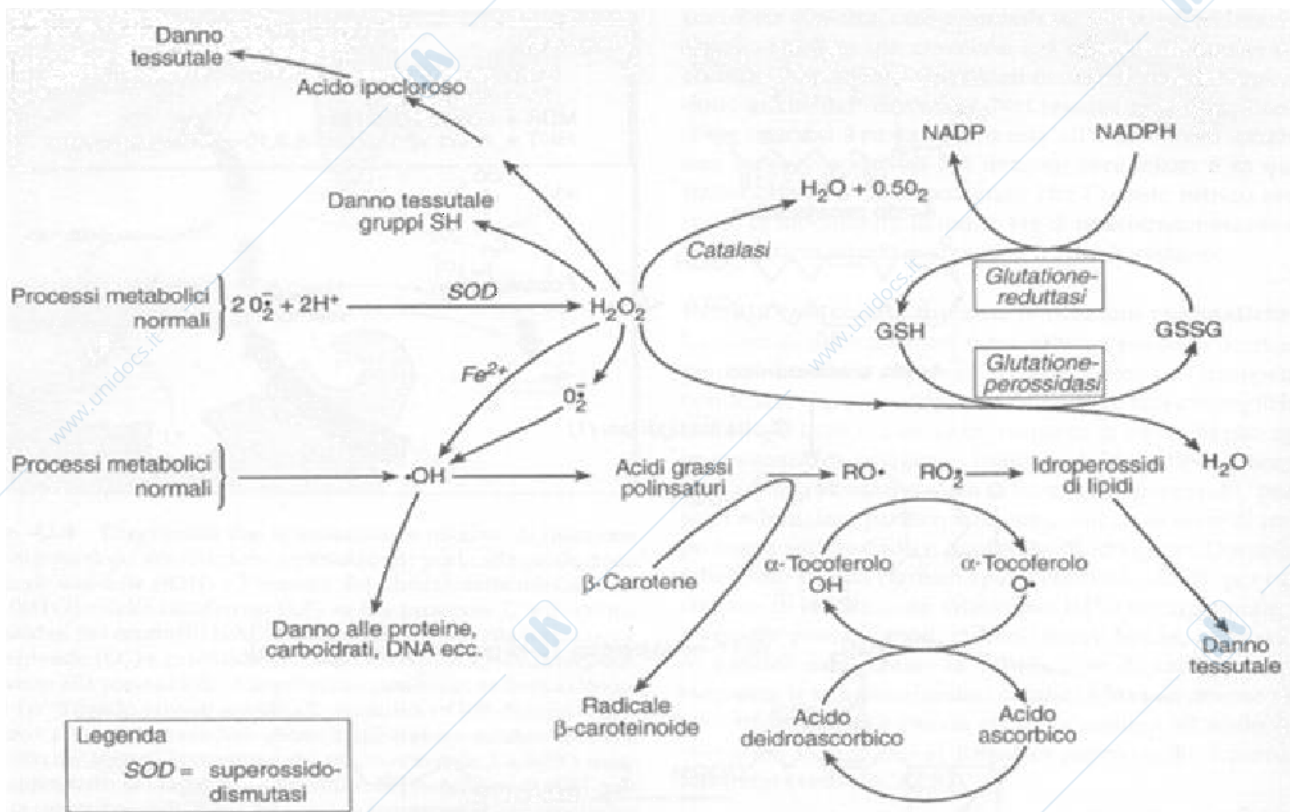
avere un danno tissutale. Per tamponare questo effetto intervengono due molecole vitaminiche accoppiate: α -tocoferolo e vitamina C. Queste due vitamine necessariamente devono lavorare insieme, perché se lavora solo una va ad esaurimento, se lavorano in coppia si rigenera il sistema antiossidante.

L'acido ascorbico si trasforma in deidroascorbico, cede la parte ossidata del tocoferolo che a questo punto da radicale a ossidril è in grado di cedere l'idrogeno al lipide stesso. Quindi vitamina C e vitamina A lavorano in coppia per limitare il danno di perossidazione lipidica dall'ossidril.

Quando guardiamo tutti gli altri componenti che possono essere facilmente degradati, noi abbiamo la coppia degli enzimi che lavorano generando prodotti che hanno bassa capacità ossidante.

La SOD genera l'acqua ossigenata ed essa è facilmente degradabile e quindi fluibile per l'organismo attraverso la trasformazione in acqua e ossigeno, che non ha più la capacità radicalica e che quindi può essere diffusibile nei liquidi ed utilizzabile durante l'atto respiratorio.

La catalasi ha questo tipo di funzione se lavora in coppia con la perossido dismutasi a monte e la glutazione perossidasi a valle, perché ogni volta che noi abbiamo capacità ossidante non radicalica del perossido di idrogeno, questo deve essere accoppiato con il sistema di rigenerazione del glutazione. Il glutazione è in grado di cedere idrogeno, il quale è fondamentale per poter trasformare il perossido di idrogeno in acqua e questo permette di avere una distribuzione più efficace degli ioni idrogeno all'interno della cellula, ma ovviamente anche qui il glutazione, se non fosse rigenerabile attraverso il passaggio di glutazione ossidato-glutazione ridotto, andrebbe ad esaurimento. Quindi il glutazione di tipo ossidato e ridotto viene rigenerato dalla coppia della glutazione perossidasi e reduttasi, che lavorano insieme e per rigenerare il GSH, il quale è il donatore per la catalasi e il perossido di idrogeno e quindi l'equilibrio viene mantenuto.



Quando parliamo del sistema dello stress ossidativo, parliamo sia del network-pro ossidante, sia del network-antiossidante e prendiamo in esame tutte le specie, sia reattive sia di difesa, perché questo equilibrio è quello che ci permette di bloccare il sistema del danno.

Il danno di una cellula può riverberare su un tessuto e su un organo e un danno di un tessuto o di un organo può riverberare sull'intero organismo, portando così ad alcune patologie quali malattie cardiovascolari, demenza, M. Di Parkinson, invecchiamento precoce ecc...

Lo stress ossidativo ha fundamentalmente 3 ruoli nella patologia, perché a seconda di come temporalmente 3 fenomeni possono verificarsi, noi abbiamo 3 correlazioni diverse:

- **RUOLO CAUSALE:** si può avere lo stress ossidativo a monte, come fattore scatenante, che induce, attraverso altri fattori metabolici, la malattia. Se in questo caso si fa prevenzione con sostanze antiossidanti, si può eliminare o quantomeno limitare ciò che scatena la patologia.
- **RUOLO PATOGENETICO:** si può avere lo stress ossidativo indotto da altri fattori, o meglio da una serie di reazioni. Questo stress ossidativo genera direttamente la malattia. Se si riescono ad individuare i fenomeni di stress che vengono alterati si può fare una terapia adatta. Si può fermare il ruolo patogenetico e quindi limitare il danno molecolare. Un esempio è quello dell'amianto: esso genera uno stress ossidativo molto elevato, per cui se si ha questo tipo di meccanismo si ha anche un effetto terapeutico.
- **RUOLO DI MARCATORE:** si possono avere dei fattori che generano una malattia che, in seguito alla malattia, generano a valle lo stress ossidativo. In questo caso è il tipo di malattia che genera lo stress, quindi a seconda del tipo di stress ossidativo che ho posso individuare quali sono i marcatori diagnostici o prognostici utili.

Malattie quali la sclerosi multipla sono malattie genetiche, questa malattia però genera uno stress ossidativo, il quale degenera ulteriormente il tessuto.

Un singolo marker è insufficiente per una corretta valutazione dello stress ossidativo del soggetto, quindi bisogna cercare un pannello di biomarcatori, ovvero un insieme di biomarcatori che possono aumentare sia la sensibilità che la specificità delle analisi e del risultato target che vogliamo.

Ciò è importante perché ogni volta che andiamo ad analizzare un aspetto possiamo correlare un determinato tipo di danno con un determinato marcatore, ma bisogna considerare che il danno può essere dato da diverse fonti: per esempio, il danno di perossidazione lipidica possiamo averlo a causa del perossido di idrogeno ma anche per alterazione di membrane che sono correlate con patologie legate ad esempio a fenomeni di alterazione del metabolismo lipoproteico; quindi i marcatori non sono mai al 100% di sensibilità e specificità.

La specificità e la sensibilità sono spesso in antitesi, infatti quando un marcatore è specifico molto spesso non è molto elevata la sua sensibilità e viceversa; ciò significa che occorre sempre mediare queste due condizioni attraverso l'unione di più marcatori. Più marcatori danno quindi un'idea dello stato fisiopatologico di tessuti, organi e quant'altro.

Per quanto riguarda i biomarcatori dello stress ossidativo, si possono verificare due tipi di fenomeni: l'attacco ossidativo (sistema network pro-ossidante), e la difesa (network antiossidante). Queste due componenti hanno dei pannelli di biomarcatori totalmente diversi.

Mentre per l'attacco abbiamo carbonili, AOPP, MDA, isoprostani, d-ROM, per il sistema antiossidante abbiamo il tocoferolo, carotenoidi, vitamina C, gruppi SH, ORAC, BAP test e così via. L'insieme di questi due pannelli ci permettono la valutazione globale dello stato di stress ossidativo del soggetto. In questo caso, quando facciamo una valutazione globale, a seconda di come le difese si sono abbassate o sono aumentate, possiamo decidere se fare prevenzione (se siamo in uno stato precoce di innalzamento dello stress) o monitorare, a medio o lungo termine, in caso di progressione.

d-ROM TEST

È un test di laboratorio che ci permette di andare a valutare i metaboliti reattivi dell'ossigeno. Questo test ci permette di determinare le concentrazioni dei radicali, ovvero degli idroperossidi; ogni volta che si ha un sistema di radicali liberi, questi generano delle sostanze che possono cercare una maggiore stabilità creando perossidi. I perossidi sono facilmente dosabili, quindi attraverso la valutazione di come si formano gli idroperossidi, e di come gli idroperossidi possono far reagire con dei cromogeni, si può fare una quantificazione spettrofotometrica. Quindi

attraverso una valutazione in spettrofotometria con la legge di Lambert-Beer, mettendomi nella zona di assorbimento in cui il cromogeno è stato trasformato, ossidato, nella condizione più colorata e quindi fare una valutazione. A 505 nm si assorbe il cromogeno della paraformilendiammina, quindi il cromogeno ossidato a 505 nm ha la maggiore assorbimento; facendo reagire l'idroperossido con il cromogeno posso valutare e quantificare quanto idroperossido c'è. Ciò permette di creare una scala di gravità dello stress ossidativo perché con bassi livelli di idroperossidi si può avere una condizione border line, ovvero una condizione in cui l'organismo fa ancora fronte a tamponare l'effetto di formazione degli idroperossidi, ed è una condizione che il sistema antiossidante non è più efficace, ma che è molto più preponderante la produzione di idroperossidi. Man mano che si aumenta la concentrazione degli idroperossidi, si può identificare con uno stress ossidativo lieve, medio, elevato o elevatissimo, in modo tale da poter dire che si è formato nel liquido biologico una quantità maggiore di idroperossidi.

Le specie radicaliche tendono, attraverso le formazioni ioniche ed enzimatiche, a trasformarsi in idroperossidi, quindi da radicaliche diventano specie non radicaliche. Il non radicalico è stabile e si può dosare, infatti il perossido di idrogeno + la paraformilendiammina ci danno una colorazione che spettrofotometricamente si può valutare: maggiore è la quantità di perossido di idrogeno, maggiore sarà stata la conversione da radicali a non radicali.

È importante dosare il perossido di idrogeno perché è semplice e perché si può fare una curva di taratura, infatti la curva di taratura non può essere effettuata esaminando un radicale perché esso è instabile ed ha una emivita brevissima. Per cui tutto il sistema antiossidante trasforma l'anione superossido, l'ossidrilico, e il componente dell'ossigeno singoletto, in perossido di idrogeno (idroperossido) che è stabile, si può dosare, ed è quantificabile con il cromogeno attraverso spettrofotometria; maggiore sarà l'assorbimento a 505 nm, maggiore sarà la quantità di perossido.

Ogni volta che si hanno concentrazioni diverse di perossido, si ha anche un risvolto clinico diverso del soggetto; quindi soggetti normali, asintomatici, che non hanno il radicale dell'ossigeno in maniera alterata, hanno solo la finalità di identificare un fenomeno di senescenza, mentre soggetti che hanno aumentati rischi, quindi che sono esposti a radiazioni ionizzanti, fumo, e quindi componenti che possono generare radicali e quindi idroperossidi da dosare, possono essere identificati come soggetti a rischio. E a seconda della fascia di stress ossidativo (lieve, medio, elevato) si può identificare il rischio di maggiore patologia del soggetto.

Se si scende nel dettaglio e si esamina il danno che può essere provocato all'interno del sistema dei lipidi, si possono ottenere due target principali: malonildialdeide e isoprostani.

MALONILDIALDEIDE E ISOPROSTANI

Questi componenti derivano da un danno sulle strutture lipidiche delle membrane.

Uno degli elementi fondamentali dell'alterazione dei lipidi di membrana è l'**acido arachidonico**; esso è una componente lipidica essenziale, costituisce la struttura del doppio strato lipidico della membrana, e quindi una sua alterazione genera un'alterazione che provoca perossidazione lipidica.

Se la perossidazione lipidica è protratta in maniera acuta si ha la formazione degli **isoprostani**, se invece è cronica (prosegue nel tempo) si formano le **malonildialdeidi**, che sono i sotto prodotti tardivi di perossidazione dei lipidi di membrana.

Tutte le membrane sono soggette ad una spontanea ossidazione intracellulare ed extracellulare dovuta a condizioni fisiologiche, e ciò comporta una alterazione della componente di membrana attraverso un metabolismo enzimatico. Uno degli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'acido arachidonico è la **fosfolipasi**. La fosfolipasi è un enzima che va a degradare l'attività dell'acido arachidonico, trasformando gli isoprostani e tutti i vari sistemi che generano una serie di molecole fisiologicamente importanti, le **prostaglandine**. Queste ultime innescano un meccanismo di ciclizzazione di alcune componenti lipidiche attraverso degli enzimi che si chiamano **ciclo ossigenasi (COX)**. Le COX sono degli enzimi responsabili del reperto infiammatorio; ogni volta che si ha un danno di membrana e un reperto

infiammatorio, si formano prostaglandine e si innescano le COX; quindi questo reperto infiammatorio è la risposta fisiologica ad uno stimolo di membrana.

Gli isoprostani derivano da un'alterazione lipidica da stress ossidativo; sono simili alle prostaglandine e possono indurre l'infiammazione, per questo la per ossidazione lipidica genera infiammazione nella componente cellulare e tissutale. Esistono diverse forme di isoprostani, chiamate **epimeri**; c'è in particolare un epimero degli isoprostani che è facile da dosare, in quanto rappresenta la forma con maggiore attività biologica, simile a quella delle prostaglandine: l'8-epi PGF 2 α .

L'isoprostano è riconoscibile da un anticorpo e attraverso una reazione colorimetrica è possibile dosarlo. Essendo l'isoprostano un elemento molto simile alle prostaglandine, può essere anch'esso prodotto fisiologicamente durante un fenomeno di ossidazione dell'acido arachidonico, quindi un soggetto sano può avere da 40 a 100 pg/ml all'interno del sistema; dosaggi quantitativamente superiori sono indicativi di un danno di membrana.

La malonildialdeide è un prodotto tardivo; ogni volta che si hanno acidi grassi polinsaturi, di media e lunga catena, che vengono scissi in frammenti più corti, si producono delle reazioni aldeidiche che generano il sistema dell'aldeide che reattiva al sistema che noi possiamo evidenziare.

In questo modo si può ottenere una qualsiasi reazione aldeidica di una qualsiasi componente, quindi i radicali liberi possono agire sulla formazione di prostaglandine e generare ulteriori processi di degradazione degli acidi grassi polinsaturi che formano aldeidi maloniche rilevabili spettrofotometricamente.

In questo caso la cosa più semplice da fare è quella di eliminare le componenti proteiche, quindi di deproteinizzare tutto il sistema, perché l'eventuale presenza di componenti proteiche ossidate possono portare alla formazione delle aldeidi; quindi si fa prima un passaggio con acido fosforico, esso degrada le strutture proteiche, precipita, esse vengono eliminate con centrifugazione, il surnatante si mette a reagire con una demetilizzazione (?) dell'acido tiobarbiturico, esso si lega alla malonildialdeide e rende visibile a 532 nm; si può anche fare non una spettrofotometria del visibile ma si può eccitare la reazione per vedere il proprio prodotto di degradazione che viene eccitato a 550.

Il livello elevato di isoprostani indica che la reazione è stata scatenata di recente, mentre un livello molto elevato di malonildialdeide indica che il danno è cronico e quindi il lipide è stato scisso nei suoi frammenti da tanto tempo. Quindi il reperto infiammatorio è molto più alto negli isoprostani elevati piuttosto che nella malonildialdeide elevata.

Se consideriamo invece il sistema delle ossidazioni proteiche, si hanno due molecole che possono essere dosate spettrofotometricamente: **carbonili** e **AOPP**.

I carbonili sono le componenti proteiche che derivano dalla ossidazione delle molecole proteiche catalizzate dalla presenza di due ioni, il ferro e il rame. Queste due componenti sono importanti perché grazie a questa induzione da ferro rame la componente perossidica è in grado di agire su alcuni amminoacidi, in particolare la lisina, l'arginina e la prolina. Quindi per poter formare carbonili si devono avere i radicali dell'ossigeno, il ferro, il rame e almeno questi tre amminoacidi.

Più elevato è il numero di elementi ossidati a carbonili, più la molecola proteica è fortemente ossidata, quindi si passa da un carbonile reversibile a un carbonile irreversibile. Il carbonile reversibile può mantenere ancora la sua funzione proteica, anche se ridotta, mentre con il carbonile irreversibile la proteina ha perso la propria funzionalità e si accumula a livello tossico all'interno dell'organismo.

Tutti i carbonili reagiscono con la dinitrofenildrazina, la quale è una sostanza che in presenza del carbonile fa un prodotto colorato (idrazone) che si può valutare a 370 nm. La idrazina reagisce con il carbonile, forma l'idroazone che cambia il proprio colore e che viene valutato a 370 nm. Maggiore è la quantità di idrazone colorato che si forma, maggiore sarà stata la presenza di carbonili che hanno reagito (legge di Lambert-Beer).

AOPP, invece, è una sigla che indica i **prodotti proteici da ossidazione avanzata**. Ciò significa che questi prodotti sono fasi ossidative avanzate nel tempo, quindi tardive. L'ossidazione proteica quindi è cronica in questo caso. Questa ossidazione viene fatta attraverso la valutazione della trasformazione della tirosina in ditirosina.

Questo ci permette di osservare come queste molecole proteiche formino dei legami crociati, i quali, a loro volta, formano degli aggregati proteici che vengono valutati spettrofotometricamente a 340 nm, perché a quella lunghezza d'onda si ha un assorbimento particolare di quelle forme proteiche aggregate.

Se osserviamo il sistema di osso guanina, cioè andiamo a vedere quali sono i fenomeni ossidativi che si possono osservare facilmente in maniera laboratoristica sul danno al DNA, ci focalizziamo sulla rilevazione spettrofotometrica della 8-oxoguanina. Quest'ultima è la trasformazione di una base nella sua forma guanosinica, cioè la forma deossigenata, ossidata da un fenomeno specifico nei confronti di una sola base, e che quindi ci permette di andare a vedere come l'alterazione di questa guanina in guanosina ci altera anche la sua presenza all'interno della doppia elica. Maggiore è la quantità di 8-oxoguanina, maggiore sarà la percentuale di danno molecolare al DNA; e maggiore sarà la sua stabile frequenza all'interno del DNA, maggiore sarà la possibilità di generare carcinogenesi.

Quindi questo marcatore funge da un lato da marcatore dello stress ossidativo molecolare, dall'altro funge da marcatore di danno al DNA. La 8-oxoguanina è facile da dosare attraverso un dosaggio spettrofotometrico a 450 nm. A 450 nm si ha l'assorbimento della 8-oxoguanina e maggiore è la sua quantità, maggiore è il danno da agente cancerogeno.

ORAC TEST (capacità di assorbire radicali dell'ossigeno)

Il risultato che si ha da questo test non è in funzione della capacità ossidante, ma della capacità antiossidante delle sostanze.

Ogni sostanza che ha una definizione antiossidante è una sostanza che toglie le sostanze ossidanti, ovvero le assorbe e le elimina dal circolo. Questa capacità viene valutata attraverso il valore ORAC. L'ORAC è la capacità di una sostanza antiossidante di inibire la degradazione di una molecola fluorescente.

In una provetta si mette una sostanza fluorescente, la quale è sensibile alla degradazione dai radicali perossinici. Quindi si inserisce il radicale perossinico, la sostanza fluorescente, e si nota che la sostanza fluorescente decade, perché il radicale la degrada. Se all'interno del sistema si inserisce una componente antiossidante, la degradazione della fluorescenza diminuisce e può essere anche bloccata, ciò dipende dalla capacità antiossidante della sostanza. Quindi maggiore sarà l'inibizione della degradazione della fluorescenza, più alto sarà il potere antiossidante della sostanza. Ciò permette di creare una scala di valori ORAC, in cui valori bassi hanno un potere antiossidante basso, e valori molto alti hanno un potere antiossidante molto elevato.

ORAC Values* of Top Antioxidant Foods per 100 grams

	Unprocessed Cocoa Powder	26,000
	Açaí Berry	18,500†
	Dark Chocolate	13,120
	Prunes	5,770
	Raisins	2,830
	Blueberries	2,400
	Blackberries	2,036
	Strawberries	1,540
	Spinach, Raw	1,260
	Broccoli Florets	890
	Red Grapes	739
	Cherries	670

La polvere di cacao ha il poter antiossidante più elevato in assoluto (tabella).

La capacità antiossidante ORAC viene espressa come unità ORAC, corrispondenti a micromoli di Trolox® equivalenti per grammo di campione, dove il Trolox® è un composto con attività antiossidante scelto come standard di riferimento. Il trolox permette quindi di avere un parametro di riferimento per tutte le altre sostanze.

Se si vogliono avere ulteriori informazioni sulla capacità antiossidante totale, bisogna tener conto del BAP (potenziale biologico antiossidante).

Il BAP non dà un valore specifico, ma tiene conto del valore globale dell'organismo, perché la capacità BAP è data dalla somma di tutti gli antiossidanti presenti nel plasma: bilirubina, acido urico, vitamina C, acido ascorbico, vitamina E, tocoferolo e tutte le altre componenti plasmatiche.

Ciò permette di creare un'indicazione di come tutto ciò che circola fisiologicamente nel sangue è una barriera oppure no nei confronti di un danno.

Si prendono gli ioni ferrici, si mettono insieme ad un cromogeno e si va a vedere qual è il tipo di reazione che crea una decolorazione del cromogeno.

Si tratta di una reazione spettrofotometrica a 505 nm che permette di fare una valutazione di come le sostanze antiossidanti che circolano nel plasma bloccano la reazione del cromogeno insieme allo ione ferrico.

Nel plasma possono essere valutati anche i pioli plasmatici. Maggiore è la quantità dei pioli, quindi dei gruppi SH presenti nelle molecole proteiche, maggiore sarà la difesa antiossidante. Se questi gruppi vengono trasformati tra ossidato e ridotto, il gruppo SH diventa gruppo SS, e quindi crea una condizione di legame che altera la funzione proteica; quindi il gruppo SH libero ha un effetto antiossidante importante. Il dosaggio può essere eseguito attraverso il legame di una sostanza che si chiama DTNB. Esso in presenza di una sostanza antiossidante diventa colorato e il colore lo si valuta a 405 nm. Quindi se le sostanze pioliche bloccano l'ossidazione del DTNB non si ha colorazione, altrimenti, maggiore è la colorazione, maggiore è il livello di ossidazione. Si parla di una valutazione diretta.

Più complessa invece è l'analisi delle componenti vitaminiche. Ciò perché le strutture vitaminiche possono avere dei livelli estremamente bassi sia nei liquidi biologici che nel plasma, per cui non è semplice fare un dosaggio spettrofotometrico o un dosaggio in ELISA e quindi la cosa più semplice per poter andare ad osservare la presenza di queste componenti è l'HPLC, quindi una cromatografia a fase inversa e ad alta pressione; per poter rilevare il picco abbiamo bisogno di detector fotometrici, quindi delle particolari particelle che vengono messe sulla lunghezza d'onda che è di riferimento per individuare quel tipo di target (450 per la proteina).

REFERTO DI LABORATORIO

Determinazione		Oggetto prestazione
Antiossidanti plasmatici		
BAP (potenziale biologico antiossidante)		Dosaggio spettrofotometrico
Tioli totali (-SH)		Dosaggio spettrofotometrico
Glutazione ridotto (GSH)		Dosaggio fluorimetrico
Carotenoidi	Luteina	Dosaggio HPLC
	Licopene	Dosaggio HPLC
	alfa-Carotene	Dosaggio HPLC
	beta-Carotene	Dosaggio HPLC
Vitamina A	Retinolo	Dosaggio HPLC
Vitamina E	delta-Tocoferolo	Dosaggio HPLC
	gamma-Tocoferolo	Dosaggio HPLC
	alfa-Tocoferolo	Dosaggio HPLC
Marcatori di stress ossidativo		
ROM (metaboliti reattivi dell'ossigeno)		Dosaggio spettrofotometrico
Ossidazione lipidica	MDA (malonildialdeide)	Dosaggio HPLC
Ossidazione proteica	AOPP (prodotti ossidaz. proteica avanzata)	Dosaggio spettrofotometrico
	Carbonili	Dosaggio spettrofotometrico
	Carbonili	Dosaggio immunoenzimatico
Profilo antiossidante + ossidativo		
Base (2 parametri)	BAP, ROM	Dosaggio spettrofotometrico
Intermedio (4 parametri)	BAP, ROM, tioli, AOPP	Dosaggio spettrofotometrico
Avanzato (10 parametri)	BAP, ROM, tioli, AOPP, MDA, luteina, licopene, beta-carotene, retinolo, alfa-tocoferolo	Dosaggio spettrofotometrico Dosaggio HPLC
Completo (15 parametri)	BAP, ROM, tioli, GSH, MDA, AOPP, carbonili, luteina, licopene, alfa e beta-carotene, retinolo, delta, gamma e alfa-tocoferolo	Dosaggio spettrofotometrico Dosaggio HPLC Dosaggio fluorimetrico Dosaggio immunoenzimatico

Il BAP come potenziale biologico antiossidante è quello che più genericamente ci dice qual è il livello antiossidante globale dell'organismo; i tioli e il glutazione sono due dosaggi semplici che ci dicono quanto il sistema SH è protettivo nei confronti delle ossidazioni sia proteiche che lipidiche; carotenoidi, vitamina A e vitamina E; marcatori di stress ossidativo. Il ROM, la malonildialdeide (a cui è aggiunto anche l'isoprostano per il dosaggio ELISA), AOPP, e carbonili sono i marcatori per l'ossidazione proteica e lipidica maggiormente utilizzati.

Questo è il sistema per vedere separatamente le diverse componenti. Se invece si vuole andare ad analizzare un profilo ossidativo più antiossidante si possono accoppiare i vari risultati o le diverse analisi. Si può per esempio andare a vedere il ROM e il BAP, quindi la capacità antiossidante e i metaboliti reattivi dell'ossigeno, oppure si può

vedere un livello maggiore di parametri (sempre accoppiati tra ossidanti e antiossidanti, come il BAP e il ROM, i tioli e l'AOPP, in modo tale da avere parametri globali sia di difesa che di attività dei metaboliti.

Fare il profilo completo di tutti i parametri ci permette di avere un'analisi più completa possibile sia dal punto di vista antiossidante, sia del profilo ossidativo. Con i diversi tipi di profili si possono ottenere degli approcci diversi, in quanto le informazioni che si possono ottenere nei diversi tipi di patologie ad essi correlati sono differenti.

Quando ci sono i ROS sulla parte membranaria, l'acido arachidonico viene ossidato e forma o componenti simili alle prostaglandine, gli isoprostani, oppure può creare dei prodotti avanzati di degradazione con le malonildialdeidi.

E' importante valutare ciò perché il sistema di difesa dell'organismo, le COX, può essere utilizzato da una parte per la formazione di prostaglandine o isoprostani, dall'altra parte per la formazione delle prostaciline, che sono i mediatori dell'infiammazione.

Se si ha un fenomeno legato alle prostaglandine si va ad aumentare l'attività trombotica, quindi si innesca il meccanismo infiammatorio che è alla base della trombosi, mentre quando si ha il fenomeno delle prostaciline si innesca tramite la COX-2 l'aumento delle prostaciline che sono mediatori dell'infiammazione. In questo caso la formazione della malonildialdeide, di isoprostani e quindi di prostaglandine e prostaciline, è mediata dall'azione della ciclo ossigenasi (COX) che dipende esclusivamente dall'acido arachidonico. Quindi tanto più l'acido arachidonico è il target dell'ossidazione da ROS, tanto più si innesca un'infiammazione COX dipendente. Per questo gli antiinfiammatori agiscono sulle COX; gli antiinfiammatori non steroidei agiscono tutti sulla COX perchè non possono bloccare il sistema di ossidazione di membrana; per questo utilizzare vitamina E, vitamina C, limita l'infiammazione in soggetti senescenti.

Questo permette di comprendere quanto l'infiammazione che nasce dal sistema membranario possa essere facilmente valutata attraverso dei test infiammatori, quali la PCR (proteina C reattiva), ferritina e transferrina che legano il ferro e quindi sono forti induttori nello stress ossidativo con le reazioni di Fenton, e le molecole proteiche che possono essere separate attraverso l'elettroforesi. Ci sono però anche dei test più specifici sul reperto infiammatorio: le interleuchine pro infiammatorie (interleuchina 1- β , e la prostaglandina e2). Questi sono dei marcatori molto specifici che vengono attivati dal sistema COX 2 che dipende dalla trasformazione dell'acido arachidonico dopo lo stress ossidativo.

Quindi i test sull'infiammazione, abbinati a test sullo stress ossidativo di membrana dei lipidi, ci danno informazioni notevoli su patologie autoimmuni come le artriti reumatoidi per esempio.

Esistono una serie di altri parametri più complessi che vanno ad evidenziare a monte della loro secrezione proteica, sulla modulazione genica, con un fenomeno di controllo dell'espressione genica. Si può acetilare o deacetilare per ottenere un controllo sull'espressione genica; se si effettua una deacetilazione si ha un arresto dell'infiammazione, mentre se si fa una acetilazione si accende la trascrizione genica, per cui lo stimolo infiammatorio va a dare l'impulso di acetilare i geni che danno una risposta genica pro infiammatoria.

Lo stress ossidativo è quindi in grado di poter acetilare, attraverso l'induzione dell'NFKB come mediatore intranucleare, alcuni geni. Ciò significa che le specie reattive dell'ossigeno sono in grado di creare danno sulle macromolecole, ma anche di acetilare alcuni geni. Quindi lo stress ossidativo ha diverse vie su cui poter agire: la via diretta e la via indiretta (acetilazione del gene e rilascio di alcuni marcatori).

Quando si parla di stress ossidativo si parla di senescenza, ovvero invecchiamento cellulare, quindi una cellula che perde la sua attività metabolica. Sono tanti i fattori che possono portare ad una senescenza, ma sono tutti correlati direttamente o indirettamente con lo stress ossidativo: radiazioni \rightarrow mutazioni somatiche, gli UV generano specie radicaliche che possono creare un danno come per esempio l'attività proteosomica ridotta (non vengono riconosciute le molecole proteiche ossidate, non vengono degradate, si accumulano, generano carbonili che sono tossici per l'organismo e ciò significa che si ha l'accumulo di queste sostanze proteiche che possono essere valutate attraverso il dosaggio spettrofotometrico dei carbonili. Quindi i carbonili sono indicativi di un danno diretto e

indicativi di un danno indiretto sul proteosoma che non li degrada ma che li fa accumulare all'interno dell'organismo stesso.

Esistono poi tutta una serie di molecole proteiche che possono aggregarsi; le aggregazioni proteiche sono per esempio le AOPP.

Questi aggregati sono stati trovati in soggetti che avevano patologie correlate con la senescenza, per esempio il Parkinson o malattie neurodegenerative, perché queste molecole proteiche accelerano il processo di degenerazione senile.

Quindi le cellule vanno incontro a disfunzioni chiamate "**sindromi di invecchiamento accelerato**".

Sono delle sindromi in cui il soggetto, per particolari molecole proteiche che vengono accumulate, acquisisce una degenerazione di forme neuronali non da patologie geniche. Quindi va incontro non ad un processo degenerativo come per esempio il Parkinson, ma da accumulo tossico di aggregati proteici che non vengono riconosciuti ed eliminati dalla via classica del proteosoma.

Esistono poi tutta una serie di altre sostanze che possono andare ad alterare la funzionalità dei mitocondri. Quando i mitocondri accumulano sostanze proteiche come aggregati, tendono a rigonfiarsi, ovvero tendono a formare i mitocondri giganti; questi sono forme mitocondriali che accumulano sostanze proteiche interne, sono tossiche, richiamano acqua e i mitocondri si rigonfiano. Questo rigonfiamento, che porta alla formazione del mitocondrio gigante, fa perdere la funzionalità al mitocondrio e può portare ad invecchiamento causato da una minore produzione di energia da parte delle componenti mitocondriali della cellula.

Esistono poi tutta una serie di insulti che sono legati alle componenti glucidiche (AGES: prodotti di glicazione terminale avanzata). Le glicosilazioni sono dei fenomeni fisiologici, attraverso le quali l'apparato del Golgi produce connessioni glucidiche per molecole proteiche che acquisiscono poi una nuova funzionalità. Se queste molecole glicoproteiche vengono ossidate nella loro parte glucidica si perde la loro funzionalità; per questo queste glicoproteine (recettori) hanno la parte glucidica ossidata in maniera protratta nel tempo, per cui queste funzionalità vengono perse. Ci sono quindi recettori ma non funzionanti, perché la parte glucidica è stata ossidata in maniera cronica ed irreversibile.

STRESS OSSIDATIVO DA ISCHEMIA E RIPERFUSIONE.

Un'ischemia è un sistema in cui il vaso va incontro ad una contrazione muscolare creando un restringimento del lume che provoca, nella parte a valle del restringimento, una ipossia, quindi un minor afflusso di sangue e di ossigeno.

La fase ischemica è una fase di reattività muscolare, e questa fase può rimanere ischemica e quindi il tessuto è un tessuto ipossico. L'utilizzo di sistemi fisiologici o di farmaci può portare questo vaso ischemico a riaprirsi lentamente (riperfusione fisiologica) oppure ad avere una riperfusione veloce come l'ischemia.

Il risultato è diverso, perché la riperfusione fisiologica non è altro che il calibro che lentamente si riapre e il tessuto a valle lentamente riprende l'ossigenazione fisiologica; questo comporta una serie di reazioni che permettono per esempio attraverso le xantina ossidasi, di riaprire il sistema, riossigenarlo in maniera adeguata.

Se ciò avviene attraverso un farmaco o attraverso una decontrazione rapida del vaso si ha una iperossia del tessuto (eccesso di ossigeno in un tessuto ipossico). Ciò provoca la riperfusione dopo ischemia, e un rilascio di perossinitrito che deriva da un radicale dell'ossigeno. La reazione di riperfusione agisce attraverso un sistema xantina-xantina ossidasi, la xantina è il substrato di azione della xantina-ossidasi, la xantina-ossidasi forma urati e libera radicali dell'ossigeno. Il radicale dell'ossigeno in presenza del ferro della molecola proteica è in grado di indurre la trasformazione di radicale dell'ossigeno in ossidrilico che è in grado di agire sia sulla cellule endoteliali sia sui neutrofilo, e quindi è in grado di creare un danno al vaso.

Nei soggetti che hanno avuto ischemia si fa sempre il dosaggio degli urati e della xantina ossidasi, perché se il soggetto ha basse quantità di xantina ossidasi o di urati nel plasma, la riperfusione non avviene. Se invece il soggetto ha elevati livelli di urati e di xantina ossidasi, esso avrà un danno più spiccato.

EFFETTO OSSIDATIVO E ATEROSCLEROSI

È legato al problema dell'ossidazione delle LDL.

Si può effettuare un dosaggio dei sistemi di malonildialdeide e isoprostani per capire il livello delle LDL ossidate. Tanto più il fenomeno è protratto nel tempo, e quindi si hanno elevate quantità di malonildialdeide, maggiore sarà la produzione e l'accumulo di LDL ossidato. Le LDL ossidate non vengono più riconosciute dalle lipasi e quindi non possono essere catabolizzate e portate all'interno del fegato per essere rielaborate, rimesse in circolo ed eliminate; esse infatti si accumulano, i macrofagi le riconoscono come no-self (estrane), il macrofago si rigonfia, si accumula nell'endotelio e crea uno strato sottoendoteliale che tende a chiudere il lume dell'arteria. Questo è il primo passaggio verso l'aterosclerosi. Da ciò ne consegue che la cellula schiumosa (ovvero il macrofago) richiamerà altri macrofagi rilasciando in questa zona le tre maggiori quantità di molecole che reagiscono come mediatori dell'infiammazione: angiopoietina, TNF- α ecc..

Questi sono sistemi (angiotensina dipendenti) che attraverso una contrazione del vaso creano la restrizione del lume del vaso che genererà poi ischemia o infarto.

STRESS OSSIDATIVO E PATOLOGIE NEOPLASTICHE

Il fenomeno dello stress ossidativo rientra in diversi step della formazione delle neoplasie; nella fase di iniziazione, produzione e progressione del sistema.

Nella fase di iniziazione una cellula normale riceve uno stimolo da ROS; se ha gli antiossidanti sufficienti pone una barriera attraverso diversi sistemi. Ma se questa cellula non ha sufficiente capacità antiossidante le sostanze antiossidanti agiscono sulle macromolecole compreso il DNA. Il DNA può accumulare insulti come la orto-oxo guanina, e può accumulare alterazioni, generando una cellula che ha una promozione verso una trasformazione neoplastica. In questo caso l'organismo ha la possibilità di reagire in quanto si tratta di una fase irreversibile. Può reagire o inducendo il sistema apoptotico oppure innescando un sistema reversibile di riparo del DNA.

Se questo fenomeno non viene riparato si accumulano insulti focali, cioè piccoli cluster cellulari in cui si sono accumulati insulti di stress a livello molecolare e proteico, queste cellule sono definite displasiche, cioè in uno stato di pre neoplasie.

Le displasie sono dei campanelli di allarme che si possono evidenziare attraverso un'analisi citometrica. Le cellule, se aggregate, secernono sostanze che creano un microambiente neoplastico favorevole, per cui si ha la irreversibile condizione di passaggio nella progressione verso una cellula neoplastica.

Il passaggio da una pre-neoplastica ad una neoplastica è dovuta a stress ossidativo ma anche a tante altre condizioni: attivazione degli oncogeni, acetilazioni dei geni e così via.

Questa trasformazione può essere identificata attraverso alcuni sistemi, quali danni al DNA. Il danno al DNA non riparato nelle condizioni fisiologiche genera senescenza, in condizioni di accumulo in soggetti metabolicamente giovani si ha un accumulo dei danni che porta ad un blocco dei sistemi di difesa. Bloccando questi sistemi di difesa apoptotici si ha una condizione di innesco di una condizione pre-neoplastica e poi neoplastica.

BIOCHIMICA CLINICA DEL FEGATO

FEGATO:ASPETTI GENERALI

Il fegato pesa circa 1.5 Kg e presenta due lobi, destro e sinistro. E' localizzato tra il diaframma (in alto) e lo stomaco e il colon trasverso (in basso). E' intercalato tra il circolo portale e quello della vena cava inferiore.

- **VENA PORTA** che apporta al fegato il sangue della milza e dell'apparato digerente;
- **ARTERIA EPATICA** che apporta al fegato il sangue arterioso che viene poi drenato dalle vene sovra epatiche.

L'unita' morfofunzionale del fegato e' il **lobulo** con gli angoli occupati da uno spazio portale che generalmente contiene un ramo dell'arteria epatica, uno della vena porta e un canalicolo biliare.

Sulla parte inferiore del lobo maggiore di destra esiste una porzione chiamata **cistifellea**. La cistifellea è la porzione in cui si riversa il contenuto della bile prodotto all'interno del fegato. La cistifellea è un organo di accumulo, elaborazione e di secrezione verso l'intestino attraverso una ritmicità della propria parete muscolare.

La componente del fegato è prettamente di tipo vascolare ed è importante perché tutto il sangue che arriva al fegato è ricco di nutrienti e quindi per questo motivo sono riversate nel fegato tutte le sostanze che sono assorbite dall'intestino o reflue dagli altri organi. La vascolarizzazione è principalmente legata a due porzioni: una arteriosa e una venosa (vena porta e arteria epatica).

La milza ha una funzione leggermente scollegata dalla funzione del fegato; il fegato è il centro metabolico di tutti i metabolismi del nostro organismo, mentre la milza ha la funzione emocateretica, cioè quella di elaborare e distruggere tutte i componenti eritrocitari all'interno del sangue.

Quindi tutto ciò che viene distrutto dei globuli rossi all'interno della milza deve poi essere trasportato, attraverso la vena porta, al fegato. Il fegato rielabora tutte le componenti proteiche e riproduce tutto ciò che può essere utile per il globulo rosso.

Il fegato quindi è costituito da due lobi, uno destro e uno sinistro, legati da un legamento falciforme che permette di riconoscere le due porzioni lobate; al di sotto c'è la cistifellea.

Le cellule epatiche portano la bile alla cistifellea. Queste cellule hanno delle caratteristiche particolari e presentano diverse componenti cellulari: lo spazio di Disse, che è lo spazio extracellulare, i sinusoidi epatici in cui si riconoscono i cordoni epatici formati dagli epatociti. Quindi l'epatocita è la singola cellula epatica che forma dei cordoni che poi a sua volta formano i sinusoidi.

All'interno del sistema cellulare si riconosce un sistema vasale (vena epatica). Questa vena porta il sangue refluo dall'intestino, è quindi una diramazione della vena porta; il sangue da qui si dirama nei diversi componenti dei cordoni e porterà il contenuto del sangue refluo dall'intestino, con tutte le sostanze assorbite con l'alimentazione, direttamente nelle cellule epatiche, le quali assorbiranno questi elementi, li metabolizzeranno e formeranno una parte di bile che andrà in cistifellea; il resto, invece, verrà distribuito in tutto l'organismo.

Tra la parte cellulare, il cordone centrale e la parte compresa tra i cordoni epatici, si riconoscono degli spazi. In questi spazi circolano dei liquidi. Nel cordone centrale esistono degli spazi in cui circola il sangue della vena. Questo non è a diretto contatto con la cellula, ma c'è la membrana plasmatica che fa da divisore, e in questo spazio ci sono le cellule del Kupffer, le quali sono macrofagi epatici. Queste cellule sono importanti perché tutto il sangue che deriva ed è refluo dall'intestino ha assorbito anche sostanze tossiche, nocive; per cui se queste componenti del sangue entrassero direttamente a contatto con la cellula epatica si avrebbe una epatite da contatto con sostanze tossiche. Mentre la presenza delle cellule del Kupffer permette di avere una barriera di difesa tra la cellula epatica e il sangue che circola.

Tra le cellule epatiche, si riversa il loro prodotto (perché l'epatocita è in grado di produrre bile). La bile viene prodotta dalla cellula epatica, costruendo acidi biliari, ma che non devono andare nel sangue, devono andare nei capillari biliari, quindi gli spazi virtuali dove circola il sangue venoso e dove circola la bile sono separati tra di loro e sono quindi due cordoni separati e distinti.

Ciò comporta che abbiamo due sistemi di canali diversi: in uno entra il sangue venoso e la cellula epatica è attaccata all'endotelio. Il sangue venoso fa assorbire la componente alla cellula epatica, quest'ultima produce gli acidi biliari e li riversa nel canalitico, quindi sangue venoso e componente biliare devono avere due canalicoli diversi.

Ciò è importante perché per poter distinguere diversi tipi di metabolismi biliari noi andiamo a dosare gli acidi biliari anche nel sangue, e quindi non dobbiamo mai confondere questi due canalicoli diversi.

Ogni volta che la vena porta porta il sangue nelle zone dei sinusoidi epatici, nel sinusoidi abbiamo da una parte l'endotelio, da una parte la cellula epatica e in mezzo il sangue che circola.

Quando prendiamo in esame nel dettaglio l'unità funzionale dell'epatocita riconosciamo diverse condizioni: gli epatociti, che sono strettamente attaccati l'uno all'altro; qui le giunzioni cellulari sono strette perché non ci deve essere la possibilità di fare un passaggio attraverso le forme cellulari. Essendo giunzioni strette queste cellule sono saldate tra di loro e non permettono passaggi intermedi; l'unico modo di passare è la cellula epatica, la quale fa da filtro. Filtra ciò che entra dal sangue e ciò che esce dalla bile.

Questo permette di separare la componente della vena porta (che immette sangue) e quello dell'epatocita.

Le cellule staminali residenti sono responsabili di una parziale rigenerazione del tessuto epatico soprattutto nel lobo di sinistra. Il lobo di destra (più grande) va meno incontro a rigenerazione.

Nel sinusoidi ci sono anche le cellule del Kupffer che funzionano con attività macrofagica o fagocitaria.

FUNZIONI DEL FEGATO

Il fegato è l'organo in cui esistono tutti i nostri metabolismi.

Il metabolismo è legato alla sintesi e alla trasformazione, il catabolismo invece è quasi sempre legato anche a tutti gli organi periferici, quindi tutti gli altri organi fanno catabolismo, ovvero utilizzano le fonti che il fegato costruisce e sintetizza per poter dare energia e funzione agli altri organi.

Nel fegato si parla di sintesi metabolica. La sintesi metabolica può avvenire in due modi, o de novo, oppure attraverso una trasformazione, creando un prodotto utile per l'organismo. Ecco perché si dice che nel fegato avviene la sintesi e/o la trasformazione di forme metabolicamente attive.

Queste forme possono essere modificate, sintetizzate e accumulate all'interno del fegato. Fondamentalmente i processi che nel fegato vengono riconosciuti sono:

- Biosintesi
- Secrezione
- Accumulo o storage
- Omeostasi.

Per quanto riguarda la biosintesi si tratta di due componenti che possono essere coniugate e trasformate in un prodotto, questa è la vera sintesi biologica. Ciò avviene per esempio per le molecole proteiche, quindi la biosintesi proteica è epatica.

Per quanto riguarda la secrezione: le cellule dei cordoni sinusoidali sono separati da quelli plasmatici, ma in quelli centrali viene prodotta la bile. Quindi la bile è un prodotto di secrezione attivo degli epatociti. Gli epatociti quindi producono bile che viene secreta dopo essere stata sintetizzata. La bile è composta da acqua, Sali minerali, acidi biliari e bilirubina. La bilirubina è un prodotto di degradazione che deriva dalla milza. Ogni volta che l'emoglobina viene degradata si forma bilirubina, la quale viene legata all'albumina e trasportata al fegato; nel fegato la bilirubina viene elaborata attraverso un fenomeno chiamato coniugazione. La bilirubina coniugata non è tossica. La bilirubina in eccesso invece entra nella composizione della bile, viene secreta dall'epatocita, va nella cistifellea e resta lì, perché nella cistifellea si accumulano i Sali biliari, ovvero prodotti di esterificazione degli acidi biliari. Gli acidi biliari,

e i Sali biliari corrispondenti, servono per emulsionare i lipidi assorbiti durante l'alimentazione e per renderli aggredibili attraverso un'attività enzimatica secreta dal pancreas, per esempio le lipasi pancreatiche sono degli enzimi digestivi secreti dal pancreas utilizzati per degradare i lipidi.

Ogni volta che il cibo passa attraverso lo stomaco esso effettua delle contrazioni e secerne la colecistochinina, una parte di questa sostanza stimola la contrazione della cistifellea che secerne la bile, una parte invece stimola la pancreozinina che fa secernere il pancreas (raga non chiedetemi che cazzo significa "secernere il pancreas", l'ho ascoltata diecimila volte e lui dice così).

Per quanto riguarda l'accumulo: nel fegato può esserci l'accumulo di diverse componenti: ferro, lipidi, vitamine, polimeri di zuccheri e così via.

Il glucosio si trasforma in glicogeno attraverso la glicogeno sintetasi. Se poi si vuole degradare il glicogeno in glucosio ci sono degli enzimi degradativi come la glucosio-6-fosfato che permette di creare una condizione di defosforilazione o l'esocinasi nel caso dell'utilizzo del glucosio per la via degradativa. Questi enzimi servono o per l'accumulo di glucosio sotto forma di glicogeno, o per degradare il glicogeno e fornire glucosio per il fabbisogno energetico.

Per quanto riguarda l'accumulo di vitamine, un esempio è la vitamina K. Se non si avesse nel fegato l'accumulo della vitamina K sarebbe molto più difficile per l'organismo far fronte ad una emorragia vasale.

Per quanto riguarda l'omeostasi: a seconda della necessità dei diversi organi la struttura del fegato varia. Se c'è una necessità di ferro, o di glucosio, il fegato toglie dal deposito il ferro o il glucosio e li mette in circolo; quindi fa una degradazione da glicogeno a glucosio e lo mette in circolo.

Il fegato regola quindi l'omeostasi perché a seconda del fabbisogno dell'organismo attiva fenomeni degradativi o di sintesi e di distribuzione di alcune componenti importanti.

L'omeostasi epatica è importante per tante funzionalità; tutto ciò che sarà al di sotto dei valori normali sarà determinato da due fattori: ipoprodotto epatico o iper fabbisogno dell'organismo, e in base a questi due livelli possiamo stabilire se c'è una sofferenza epatica o un aumentato bisogno patologico o fisiologico all'interno dell'organismo.

Ci sono alcune attività che sono del fegato e di altri organi, ed altre attività che, invece, sono esclusive del fegato.

Le funzioni fegato-specifiche sono: detossificazione dei farmaci (avviene attraverso il citocromo, o il sistema del glutatione), biosintesi di proteine e lipoproteine, sintesi degli acidi biliari, glicogenesi (ovvero β -ossidazione degli acidi grassi).

Esistono poi una serie di metabolismi che possono essere trovati anche in altri organi: la gluconeogenesi (capacità di riformare glucosio), ureogenesi (formazione dell'urea).

LEZIONE 11 (20 NOVEMBRE MATTINA).

Le proteine che circolano nel plasma, quindi le glicoproteine, le lipoproteine e le proteine plasmatiche sono di sintesi epatica.

Proprio per questo utilizziamo il plasma per valutare se ci sono danni periferici o danni d'organo, infatti se si trova una anomalia delle proteine plasmatiche molto probabilmente il fegato è alterato.

La degradazione dell'emoglobina, come sappiamo, avviene nella milza. Si riconoscono due fasi della distruzione dell'emoglobina: fase extraepatica e fase intraepatica. La fase extraepatica è di derivazione della milza.

FEGATO E METABOLISMO PROTEICO

Tutte le proteine sono costituite da amminoacidi, i quali vengono distinti in lineari, a catena ramificata, aromatici e così via. Fondamentalmente però, gli amminoacidi, sono suddivisi in essenziali, semi-essenziali e non essenziali.

Il concetto di essenzialità degli amminoacidi nasce da quanto gli amminoacidi possono essere sintetizzati in maniera autonoma dall'organismo, oppure devono essere supplementati in maniera autonoma dall'esterno.

Gli amminoacidi essenziali sono: metionina, trionina, leucina, triptofano, instidina, fenilalanina, lisina, serina. Questi amminoacidi sono essenziali e non sono sintetizzati dall'organismo, ma necessariamente devono essere assunti dall'esterno. Tutte le molecole che contengono la maggior parte di questi amminoacidi possono essere fosforilate e ciò è importante perché la fosforilazione è molto importante per la regolazione di una molecola, infatti una molecola, fosforilata o defosforilata, cambia la propria attività funzionale all'interno dell'organismo.

Grazie a questi amminoacidi essenziali si producono tre amminoacidi intermedi definiti semi-essenziali. Sono definiti semi-essenziali perché non si possono produrre attraverso l'organismo, dipendono dagli amminoacidi essenziali; la cisteina, per esempio, è un amminoacido solforato ed è indispensabile per avere i gruppi SH liberi nelle molecole proteiche; esso non si può sintetizzare ma si può ottenere solo attraverso una modificazione della metionina. Un altro esempio: se non avessimo la fenilalanina, non si potrebbe avere la tirosina e quest'ultima è indispensabile per ottenere un amminoacido che darà origine ad una molecola proteica che è indispensabile per alcune funzionalità (vedremo dopo).

Alcuni amminoacidi sono definiti non-essenziali perché li produce il nostro organismo. Alcuni di questi possono essere facilmente trasformati attraverso dei cicli proteici: un esempio è il passaggio da aspartato a glutammato.

Se consideriamo la via glicolitica, nel primo passaggio si forma la 3-fosfo-glicerato. Quest'ultimo se perde componenti amminiche si trasforma in un amminoacido essenziale, la serina. Quindi da una via metabolica del glucosio otteniamo una forma di amminoacido che è importante per la sintesi proteica. Questo ci fa notare quanto le vie metaboliche legate per esempio alla via glucidica entrano nella sintesi proteica. Anche il piruvato, a seguito di un'ulteriore amminazione (aggiunta di uno ione ammonio), si trasforma in alanina (amminoacido). Anche dal ciclo dell'urea, per esempio, si forma un amminoacido essenziale: l'arginina.

Quindi da metabolismi diversi, degli acidi nucleici, dei lipidi, delle componenti glucidiche, possiamo ottenere vie correlative anche per la sintesi delle proteine che circolano nel plasma.

Le proteine plasmatiche che possiamo identificare attraverso la sintesi epatica sono principalmente l'albumina, le globuline α_1 , α_2 e β . Vengono escluse però le gamma globuline perché di esse fanno parte gli anticorpi che non vengono sintetizzati dal fegato, bensì dalle plasmacellule. Anche tutti i fattori di coagulazione hanno una biosintesi epatica, mentre tutti gli altri fattori che entrano nella produzione delle componenti globuliniche delle proteine sono escluse dalla biosintesi epatica.

FEGATO E METABOLISMO GLUCIDICO

In realtà quando noi parliamo di metabolismo glucidico intendiamo non solo quello del glucosio, ma di tutte le componenti glucosate, quindi di tutti i carboidrati. Esistono diverse forme di carboidrati in base alle catene che li formano: triosi, pentosi, esosi..ecc.

L'omeostasi glucidica all'interno dell'organismo è importante perché permette quindi di fornire zucchero alle cellule che è la prima fonte di energia dell'organismo. Il fegato immagazzina sotto forma di glicogeno il glucosio disponibile, perché a seconda di un eventuale fabbisogno libera il glicogeno, lo degrada e quindi libera il glucosio il quale è immediatamente disponibile per le differenti funzioni cellulari attraverso il trasporto plasmatico. La capacità di sintetizzare glicogeno, a partire da glucosio, si chiama glicogeno sintesi.

N.B. Nel mondo vegetale la stessa funzione del glicogeno viene svolta dall'amido, sintetizzato sempre a partire dal glucosio.

Quando il glicogeno viene degradato, per risintetizzare glucosio, questo processo si chiama glicogeno lisi, e rende immediatamente disponibile il glucosio, il quale viene fosforilato e utilizzato nelle forme cellulari di interesse. Può esistere anche la condizione in cui non si ha più glicogeno e si è consumato il glucosio; questo è il caso in cui il fabbisogno "dice" all'organismo (principalmente al fegato) di produrre nuovo glucosio, a partire da altre componenti differenti da zuccheri.

Si possono utilizzare degli amminoacidi per sintetizzare il glucosio. Si effettua una deaminazione della alanina e della serina, ovvero si elimina la componente ammoniacale (NH_4^+) e in questo modo si ottiene nuovamente il 3-fosfoglicerato, oppure una componente del piruvato. Questo processo è chiamato gluconeogenesi.

Il glucosio può seguire sia la via glicolitica che la via dei pentoso fosfati. In questo caso da un esoso (glucosio) si ottengono dei pentosi, quali per esempio il ribosio e il desossiribosio. I glucidi possono essere anche convertiti in acidi grassi. Se si fa un'alimentazione iperglicidica l'organismo prende la componente degli zuccheri, li elabora e utilizza per fare energia, gli zuccheri in eccesso prendono la via della biosintesi degli acidi grassi.

L'insufficienza epatica si ha quando il fegato non riesce a far fronte ad un fabbisogno particolare. Si può avere una condizione acuta ed una condizione cronica; la condizione acuta è momentanea, se invece non è momentanea, ma si protrae nel tempo si dice insufficienza cronica.

Con la condizione acuta si consuma troppo glucosio e si va in ipoglicemia, quindi il fegato non è in grado di degradare ulteriore glicogeno; l'ipoglicemia manda in difficoltà il muscolo, il sistema cerebrale, il sistema del pancreas. Si può avere quindi un calo di pressione, un deficit cognitivo, un deficit nella produzione di ormoni, e un deficit dell'attività muscolare.

L'insufficienza epatica cronica viene riconosciuta da una iperglicemia (accumulo eccessivo di glucosio nel sangue) che il fegato non riesce del tutto a metabolizzare. La iperglicemia porta ad un non corretto funzionamento di organi e sistemi all'interno dell'organismo: funzionalità muscolare, sistema del pH, un'attività neurologica alterata.

FEGATO E METABOLISMO LIPIDICO

L'epatocita è in grado di fare biosintesi, quindi produrre acidi grassi di diversa catena e quindi di diversa lunghezza carboniosa, oppure possono essere sintetizzati acidi grassi ciclici quali per esempio il colesterolo. Possono essere costruiti anche gli esteri attraverso la produzione dei trigliceridi. Gli atomi di carbonio che costituiscono l'acido grasso possono essere legati da un singolo o da un doppio legame; la presenza del doppio legame rende l'acido grasso insaturo. Il metabolismo lipidico può portare alla sintesi dei fosfolipidi e delle lipoproteine.

Tra le lipoproteine si distinguono due classi: LDL e HDL, in base alla densità proteica. Le HDL hanno una maggiore densità rispetto alle LDL.

I lipidi possono andare incontro ad un metabolismo classico (β -ossidazione), oppure, per esempio ad un fenomeno ossidativo, quale la perossidasi lipidica.

La biosintesi del colesterolo (forma ciclica di grasso) è importante perché ci permette da un metabolismo ciclico di entrare a far parte di un metabolismo ormonale, perché tutti gli ormoni steroidei hanno la base ciclica del colesterolo.

All'interno della via metabolica ormonale si hanno le aromatasi che permettono di fare trasposizione e trasformazione di estrogeni in androgeni.

Altra sintesi è quella dei corpi chetonici; quando il lipide viene ossidato attraverso la via di β -ossidazione fisiologica, si producono degli elementi chetonici (acidi) di corta catena che possono accumularsi nell'organismo e che devono

essere espulsi attraverso l'emuntorio renale o attraverso il sudore; questi elementi sono l'acetoacetato, l'acetone e l'acido β -idrossibutirrico, i quali sono prodotti di scarto, non riutilizzabili.

FUNZIONE SECRETORIA

Questa funzionalità permette di identificare anche nel fegato la capacità di ghiandola esocrina, ovvero quella ghiandola che produce componenti e li immette al di fuori della sede dell'organo.

La ghiandola endocrina produce un secreto che immetto direttamente nel circolo ematico, la ghiandola esocrina, invece, produce delle sostanze e le immette al di fuori della componente cellulare.

La funzione secretoria del fegato è quella di produzione della bile; la bile attraverso dei canalicoli va nella colecisti, cioè una struttura ampollare in cui il secreto della bile si riversa e si accumula. Dalla colecisti, attraverso un coledolo, va verso l'intestino, nell'ampolla del duodeno. Queste due componenti permettono di riversare opportune quantità di bile ogni qual volta ci sarà il passaggio del cibo attraverso lo stomaco. Nella parete dello stomaco ci sono diverse fasce muscolari e ciò comporta che, la contrazione trasversale ritmica delle componenti muscolari della parete dello stomaco, crea una ritmicità che porta al rimescolamento del bolo alimentare, il quale si deve rimescolare con la componente acida gastrica per poter cominciare la prima fase di digestione, poi supera il piloro (valvola che separa lo stomaco dal duodeno), viene neutralizzata dalla componente che deriva dal pancreas, ma tutte le componenti lipidiche devono poter essere elaborate, degradate, metabolizzate; e queste possono essere metabolizzate solo se la componente lipidica viene emulsionata.

Tutti gli acidi biliari e le varie componenti biliari che costituiscono la bile hanno la funzione di emulsione dei grassi. Se non ci fosse la bile tutte le componenti lipidiche non sarebbero degradate e verrebbero perse attraverso l'emuntorio fecale; grazie alla presenza della bile queste vengono solubilizzate, rese idrosolubili, aggredibili dalle lipasi del pancreas e quindi scindibili nei diversi componenti.

La bile è costituita da acqua ed elettroliti (82%), *sali biliari (elevato potere emulsionante)* (12%), *fosfolipidi* (4%), *colesterolo* (< 1%), *bilirubina coniugata (legata ad acido glucuronico)*, *biline*, *molecole endogene/esogene (o loro metaboliti)*.

La bile quindi è importante perché grazie ad essa possiamo avere l'assorbimento dei lipidi attraverso l'intestino e di tutte le sostanze liposolubili, quali vitamine liposolubili, lipoproteine, colesterolo, fosfolipidi. Un'altra funzione fondamentale è l'eliminazione dei cataboliti che possono risultare tossici.

La bile gioca un ruolo importante nell'omeostasi del colesterolo.

Quando si osserva il metabolismo nel dettaglio quello che si osserva sono due componenti: extraepatica, intraepatica. La extraepatica avviene nella milza (organo emocateretico). Il monocita trasformatosi in macrofago riconosce il globulo rosso invecchiato, lo degrada, si libera emoglobina ed essa va incontro ad un catabolismo ad opera di due enzimi che lavorano in sequenza: emeossigenasi che degrada la parte eme dell'emoglobina, stacca il ferro e produce la biliverdina, la quale è un prodotto instabile che viene immediatamente degradato da un ulteriore enzima, biliverdina reductasi; l'opera di questi due enzimi in coppia producono bilirubina finale. La bilirubina è un componente libero e molto tossico, infatti se dalla milza dovesse uscire bilirubina libera circolante nel sangue, crea problemi neurologici, muscolari e metabolici all'organismo.

Normalmente la bilirubina, all'interno della milza, viene complessata con l'albumina; essa è la proteina che principalmente (80%) circola libera nel sangue.

Quando l'albumina si lega alla bilirubina non la rende tossica e la veicola attraverso il sangue fino al fegato. Arrivata nel fegato l'albumina si stacca e la bilirubina entra a far parte del sistema dei canalicoli biliare solo dopo essere stata trasformata attraverso la coniugazione dell'acido glucuronico. A questo punto la bilirubina coniugata non è tossica, si

accumula nella cistifellea e da lì va nell'intestino per sintesi, degradazione e metabolismo e poi viene persa attraverso le feci.

L'enzima che ha la capacità di cedere la componente glucuronica alla bilirubina si chiama UDP glucoronil.

PATOLOGIA EPATICA

Quando si parla di patologie del fegato si intendono le epatopatie, e all'interno di queste si distinguono le patologie primarie e le patologie secondarie.

Le primarie sono del fegato, le secondarie sono quelle che possono incidere sul fegato ma che in realtà coinvolgono l'intero organismo ma incidono anche sul fegato, quindi si tratta di patologie diffuse e circoscritte.

Le diffuse sono quelle sistemiche, ovvero che coinvolgono l'intero organismo, per esempio un virus, le stasi epatiche, una steatosi.

Le circoscritte riguardano solo il fegato, per esempio gli ematomi che creano una bolla di sangue coagulato all'interno dell'organo.

Le componenti istologiche, anatomiche e funzionali vengono osservate con i marcatori.

TRE LIVELLI DI TEST

Livello di massima correlazione con la funzionalità epatica; Ci aiuta sempre per la specificità ma non è diretto; Test diagnostici, mirati ad identificare solo ed esclusivamente patologie epatiche.

I test di funzionalità primaria sono molto pochi, perché ci dicono in maniera esclusiva se esiste o meno una epatopatia; nel migliore dei casi questi test ci danno una possibilità dell'80%, quindi la specificità e la sensibilità non sono elevatissime, anche se, sommando più test, aumenta la probabilità. Bisogna quindi effettuare sempre più test, e non un singolo.

I test di funzionalità primaria sono di 3 tipi:

- **Test di citolisi;** questo test dice se c'è stato un danno necrotico dell'epatocita, perché tutto il contenuto intraepatocita, lo si trova anche all'esterno circolante nel sangue.
- **Valutazione della capacità di sintesi o metabolismo;** valutare se l'epatocita metabolizza o sintetizza in maniera corretta.
- **Test di escrezione;** valutare se la capacità del fegato è orientata nella parte di organo esocrino in grado di secernere la bile, e se è alterata o meno.

Questi test non valutano, in maniera qualitativa, la capacità del fegato di svolgere le sue numerose funzioni, ma danno un'indicazione sull'esistenza, l'estensione e il tipo di danno epatico.

CLASSIFICAZIONE

Ci sono dei marcatori di citolisi, dei marcatori di colestasi, marcatori di protidosintesi, e marcatori di coniugazione. Questi fanno tutti parte della componente di test di primo livello.

Ognuno di questi 4 gruppi di marcatori prende in esame una particolare forma di danno: la citolisi riguarda danni di rottura dell'epatocita, la colestasi di funzionalità nel produrre le componenti epatiche, la protidosintesi riguarda solo le proteine e la coniugazione permette di capire se la bilirubina è libera o coniugata e in che modo va in circolo.

All'interno di queste 4 classi ci sono molte molecole proteiche, di cui alcune sono costitutive e altre a carattere enzimatico.

Principali marcatori sierologici utili per l'esplorazione della fisiopatologia epatica

Marcatori di Citolisi	Alanina aminotrasferasi (ALT, GPT)
	Aspartato aminotrasferasi (AST, GOT)
	Gamma-glutamil-trasferasi (γ -GT)
	Lattato deidrogenasi (LDH)
Marcatori di Colestasi	Fosfatasi alcalina (AP)
	Gamma-glutamil-trasferasi (γ -GT)
	Bilirubina totale e frazionata
Marcatori di Protidosintesi	Albumina e altre siero proteine
	Pseudocolinesterasi
	Tempo di Quick
Marcatori di Coniugazione	Bilirubina totale e frazionata (coniugata e non coniugata)

TEST DI SECONDO LIVELLO.

Test ancillari che cooperano nell'identificazione della patologia epatica, ma non sono molto specifici. Sono test complessi non ancora in uso nella pratica clinica, utilizzati per ricerche in particolare per il trapianto di fegato o per monitorare l'efficacia di nuovi farmaci in corso di epatopatia. Esempio sono: Clearance dell'antipirina, del galattosio, verde di indo cianina; quest'ultimo ci rende fluorescente il canalicolo biliare e ci permette di vedere la funzionalità soprattutto nei problemi legati all'ittero.

TEST DIAGNOSTICI

Servono per fare diagnosi. Una volta differenziati i principali quadri clinici (ostruzione del tratto biliare, danno acuto epatocellulare, malattia epatica cronica) attraverso i test di funzionalità epatica, si eseguono test specialistici finalizzati all'identificazione di specifiche epatopatie.

Esempio: AFP, test virologici per diagnosi di epatite virale.

VALUTAZIONE DELLA CITOLISI (indicatori di lesione epatocellulare (danno/necrosi))

La citolisi (danno epatico dovuto alla rottura della cellula epatica) provoca il riversamento del contenuto intracellulare nell'ambiente esterno, nel plasma circolante, ciò comporta la valutazione degli enzimi specifici della cellula epatica.

I quattro enzimi maggiormente identificabili come specifici e sensibili della funzionalità epatica sono: aspartato transaminasi (AST), alanina transaminasi (ALT), LDH, γ -GT.

Le due transaminasi trasportano i gruppi amminici da un substrato all'altro; esse possono avere un duplice nome perché possono essere denominate o in base ai substrati, o in base ai prodotti. Per esempio:

Glutammico-ossalacetico transaminasi o Aspartato transaminasi	Glutammico-piruvico transaminasi o Alanina transaminasi
GOT o AST	GPT o ALT

LDH è costituita da 4 subunità, le quali, accoppiate a due a due danno cinque isoenzimi, e questi avranno una specifica localizzazione nei tessuti con una determinata funzione. La γ -GT trasferisce i gruppi glutammici.

Le due transaminasi hanno principalmente una funzione epatica, però non sono esclusive del fegato. Si tratta di enzimi che catalizzano gruppi amminici ad alfa-chetoacidi che sono componenti presenti nel catabolismo della componente proteica o glucidica. La AST si trova nel citosol e nei mitocondri, ed è sia epatica che muscolare; La ALT è esclusivamente citosolica, quindi è prevalentemente di tipo epatico.

Quindi, se si trovano alti valori di ALT allora ciò significa che vi è un danno epatico, se si trovano alti valori di AST si ha o un danno epatico, o uno muscolare.

Queste due forme di transaminasi hanno una correlazione con l'alimentazione: se si ha un'alimentazione che non porta all'assorbimento di vitamina B-6, le due transaminasi si alterano, allo stesso modo anche una eccessivo quantitativo della vitamina B-6. L'AST è un enzima aspecifico, è presente nel fegato, nel muscolo cardiaco e nel muscolo scheletrico e può avere una rifusione anche a livello eritrocitario. Esistono due pool di questo enzima: parte mitocondriale e parte citoplasmatica; più o meno sono equivalenti.

Questo enzima può essere trovato fisiologicamente nei neonati. I neonati vanno incontro a sofferenza, possono subire dei danni, ed avere un'alterazione funzionale dovuta alla AST neonatale; si tratta di un picco che si risolve in 72h e dopo 72h il picco torna nella norma; si tratta quindi di una AST da travaglio.

Ci sono casi in cui vi è una moderata alterazione della ASP (cirrosi epatica, ittero colestatico, metastasi epatiche, epatocarcinoma, insufficienza cardiaca, scompenso cardiaco, mononucleosi infettiva, malattie muscolari, emolisi) e casi in cui invece l'alterazione dell'ASP è marcata (epatite virale acuta, necrosi epatica su base tossica, infarto del miocardio(*Tuttavia, gli aumenti della AST sono maggiori in corso di epatite virale rispetto a quelli riscontrati nell'infarto del miocardio, questo fenomeno è dovuto alla più vasta massa di tessuto interessata dalla necrosi.*), gravi traumi muscolari, gravi situazioni di ipossia tissutale, epatite autoimmune).

Se consideriamo, invece, la ALT, essa ha una emivita molto più lunga (48h).

L'ALT si alza nelle **epatiti acute** (sia su base virale che tossica) e nella maggior parte delle epatopatie, l'attività dell'**ALT aumenta nel siero molto più rapidamente** della AST, sia perché l'AST è inattivata più rapidamente, sia perché l'ALT, presente soprattutto nel citoplasma, diffonde più rapidamente attraverso la membrana cellulare.

Aumenti di minore entità si osservano nella cirrosi epatica, nell'ittero colestatico nella stasi da insufficienza cardiaca e nella mononucleosi infettiva.

Se consideriamo l'epatite virale e l'epatite alcolica, esse comportano un aumento differente dell'AST e ALT:

- **Epatite virale → ALT > AST**
- **Epatite alcolica → AST > ALT** (poiché il danno è prevalentemente mitocondriale, infatti l'alcool induce il rilascio della AST mitocondriale anche in assenza di necrosi cellulare e ne aumenta l'attività; inoltre la ALT è più sensibile al deficit di piridossina, comune nell'alcolismo, per cui tende ad essere più bassa). Nell'epatite alcolica il rapporto GOT/GPT è maggiore di 2.

Se consideriamo le differenze tra le due transaminasi si può dire che l'ALT è molto più sensibile, precoce, e facile da trovare, mentre l'AST è più tardiva.

Questi due enzimi, soprattutto l'ALT, vengono rilasciati precocemente nell'arco di 36h anche in pazienti asintomatici, ciò significa che un paziente che ha un danno epatico, che ancora non manifesta il danno clinico, può avere un aumento di questo enzima. Ciò significa che tanto più precocemente questo enzima viene diagnosticato, tanto più facile sarà la riduzione del danno epatico.

Viene effettuato il dosaggio dell'AST e il dosaggio dell'ALT e il loro rapporto: Epatiti virali (danno minimale): $AST/ALT \leq 1$; Danno esteso: $AST/ALT > 1$.

Il grado di elevazione delle transaminasi può essere definito **lieve** (<5 volte il limite superiore dell'intervallo di riferimento: url), **moderato** (5-10 volte l'url) e **marcato** (>10 volte l'url).

Altre condizioni in cui ↑ transaminasi:

- Siderocromatosi
- morbo celiaco

- malattia di Wilson
- deficit di a1-antitripsina
- iper-ipotiroidismo
- farmaci (antiepilettici, statine, FANS, antitubercolari, amiodarone).

POSSIBILI ERRORI PREANALITICI...

Fattori di variabilità che possono influenzare i risultati dei dosaggi di AST and ALT indipendentemente dalle patologie epatiche

Fattore	AST	ALT
Ora del prelievo	Scarsa influenza	45% di variazione: concentrazioni più elevate nel pomeriggio e più basse nelle ore notturne
Variazioni fra giorni	5-10% di oscillazione dei valori da un giorno all'altro	10-30% di oscillazione dei valori da un giorno all'altro
Etnia/genere	Valori più elevati del 15% in uomini afro-americani	
Indice di massa corporea (BMI) relazione diretta fra peso e livelli di AST, ALT	Incremento del 40-50% con un elevato BMI	Incremento del 40-50% con un elevato BMI
Ingestione di cibo	Nessun effetto	Nessun effetto
Esercizio	Incremento di 3 volte la norma con un esercizio strenuo	Riduzione del 20% in soggetti che eseguono costantemente un'adeguata attività fisica
Effetto della temperatura di conservazione (siero separato dal coagulo)	Stabile: a temperatura ambiente per 3 giorni; a 4-8°C per 3 settimane (<10% di riduzione); per anni a -20°C (10-15% di riduzione)	Stabile: a temperatura ambiente per 3 giorni; a 4-8°C per 3 settimane (10-15% di riduzione). Riduzioni marcate per procedure di congelamento/scongelo
Emolisi in vitro, anemia emolitica	Incremento significativo in dipendenza del grado di emolisi; generalmente incrementi meno significativi rispetto alla LDH	Incremento moderato

LDH

E' un enzima citosolico, Enzima della glicolisi che catalizza la conversione del lattato in piruvato (il prof dice che trasforma il piruvato in acido lattico).Espressa nel fegato, cuore, polmone, rene e cellule ematiche.

Si tratta di un enzima che lavora in anaerobiosi, l'acido lattico non è ulteriormente smaltibile, si accumula nel muscolo e genera il crampo. Se invece lavoriamo in aerobiosi, il piruvato passa direttamente nel mitocondrio per fare un'attività di tipo fosforilativo-ossidativa per produrre ATP.

LDH è un marcatore tessuto aspecifico, perché quasi tutte le cellule hanno la capacità di contenere questo enzima al proprio interno; ciò che varia è l'isoenzima: LDH è un enzima **tetrameric** costituito dall'associazione di quattro subunità di due tipi diversi: **H (heart) e M (muscle)** che diversamente combinate danno origine a **5 isoenzimi** caratterizzati da una diversa localizzazione negli organi e nei tessuti in base al prevalere di un metabolismo di tipo aerobio o anaerobio. Se si hanno 4 subunità H avremo l'isoenzima 1, se si hanno 3 subunità H e 1 M si avrà l'isoenzima 2, 2 H e 2 M l'isoenzima 3, 1 H 3 M isoenzima 4, 4 M isoenzima 5.

Questi isoenzimi avranno una distribuzione differente nei vari tessuti; l'isoenzima 1 e 2 sono prevalentemente accumulati all'interno della cellula muscolare cardiaca, mentre le altre forme possono avere distribuzioni che possono variare anche a seconda della fisiologia, attività fisica ecc.

Il dosaggio della LDH totale è un indice **poco sensibile** di danno epatocellulare, in quanto aumenti sierici moderati di LDH si riscontrano **nell'epatite virale acuta, nella cirrosi e nel carcinoma epatocellulare**; invece, aumenti sierici elevati di LDH, in associazione con alterazioni di altri parametri di funzionalità epatica, si riscontrano nei linfomi. La quantità di LDH è correlabile con la massa del danno: più è grande il danno tissutale, più elevata è la quantità degli isoenzimi che si possono trovare. L'isoenzima 1, che si può trovare sia nel cuore sia nel globulo rosso, e proporzionalmente aumentata alla grandezza del danno.

Il dosaggio della LDH totale è un indice **poco sensibile** di danno epatocellulare, in quanto aumenti sierici moderati di

LDH si riscontrano **nell'epatite virale acuta, nella cirrosi e nel carcinoma epatocellulare**; invece, aumenti sierici elevati di LDH, in associazione con alterazioni di altri parametri di funzionalità epatica, si riscontrano nei linfomi.

VALUTAZIONE DELLA COLESTASI

Con il termine colestasi si intende l'accumulo della bile all'interno del fegato e non nella coecisti. Il fegato produce correttamente la bile, ma non la riversa ,attraverso i cannicoli biliari, nella cistifellea. Nel rimanere nel fegato si genera una sofferenza epatica tossica definita colestasi.

E' importante valutare la colestasi perché se meno bile va nella cistifellea, meno bile andrà nell'intestino, e quindi ci sarà meno assorbimento di alcune sostanze. Quindi la colestasi è anche una limitazione dell'assorbimento di grassi, zuccheri e quant'altro.

La colestasi può avere due localizzazioni: intraepatica e extraepatica.

La intraepatica è un difetto di secrezione da parte dell'epatocita, il quale produce correttamente la bile ma la trattiene all'interno del fegato. In questo caso ci possono essere colestasi epatocitaria, oppure a livello delle vie biliari. Se la bile rimane all'interno del fegato si ha un danno della cellula epatica e l'intestino non assorbe lipidi e vitamine liposolubili, in questo caso si ha un fortissimo dimagrimento.

Se invece la colestasi è extraepatica, la bile non viene trattenuta all'interno delle cellula epatica ma è al di fuori del fegato, quindi il fegato non avrà un danno diretto, ma il danno sarà legato alla cistifellea e al coledoco (tubo che trasferisce la bile dalla cistifellea all'intestino), e l'unico danno che si può riconoscere è la calcolosi delle vie biliari.

La colestasi, se protratta nel tempo, immette bilirubina nel sangue; quando la bilirubina raggiunge una quantità superiore di 2 mg/l dà l'ittero. Fare un dosaggio prima della sintomatologia può evitare che il paziente vada incontro a danni d'organo.

LEZIONE 11 POMERIGGIO

Un altro importante parametro riguardo la produzione epatica è l'enzima **fosfatasi alcalina (ALP)**. Questo enzima ha affinità con substrati idrosolubili e presenta un'emivita abbastanza lunga, infatti, può rimanere in circolo senza diminuire la propria attività totale fino a 3 giorni. Per 72h sarà molto stabile e quindi utilizzabile come marcatore, sia precoce sia duraturo. La fosfatasi alcalina presenta una diversa capacità di essere percepita quantitativamente nel plasma a seconda dell'età del soggetto: in età pediatrica la concentrazione sarà maggiore, nella fase adolescenziale resta comunque elevata ma in evidente diminuzione ,nell'adulto sarà molto bassa per poi aumentare nuovamente in età senile.

Le caratteristiche tessuto-specifiche hanno permesso di identificare almeno 3 isoforme:

- l'isoforma intestinale → compare fisiologicamente dopo ogni pasto
- l'isoforma epatobiliare → legata all'attività del fegato è presente nei dotti biliari.
- l'isoforma ossea → prodotta dagli osteoblasti, ha un ruolo chiave nel processo di mineralizzazione ossea: inibisce il pirofosfato (inibitore della mineralizzazione) favorendo la deposizione del materiale minerale sulla matrice organica dell'osso in formazione.

Inoltre è presente l'isoforma placentare la cui attività è legata esclusivamente alla gravidanza (a partire dal 3° trimestre fino ad il 1° mese successivo al parto) ed è prodotta dal tessuto placentare. Quest'isoforma è legata all'adesione della placenta verso quella uterina (?) e la sua presenza al di fuori della gravidanza ha importanza dal punto di vista neoplastico.

In condizioni fisiologiche l'ALP totale aumenta nell'accrescimento e in gravidanza mentre in condizioni patologiche , invece, aumenta nell'epatopatie e nelle malattie ossee

I valori elevati di bambini e adolescenti sono dovuti al maggiore ricambio osseo. Talvolta negli adulti ci possono essere valori elevati durante la guarigione da fratture ossee, per una elevata attività osteoblastica. Valori superiori alla norma a livello patologico possono essere indice di artrite deformante, carcinoma biliare, epatite, metastasi epatiche e ossee, alterazioni delle vie biliari, mieloma, mononucleosi, osteomielite, rachitismo, sarcoidosi, insufficienza renale, sarcoma osteogenico. Valori inferiori, invece, possono essere causati da anemia, età avanzata, ipotiroidismo, malnutrizione, arresto della crescita, diminuzione di Zinco e Magnesio.

Quando ci sono dei danni al fegato, le cellule danneggiate rilasciano grandi quantità di questo enzima nel sangue. Pertanto, questo test viene spesso utilizzato per rilevare ostruzioni delle vie biliari, dal momento che l'ALP si trova in alte concentrazioni ai margini delle cellule che rivestono i dotti. Se è presente l'ostruzione di uno o più condotti, per esempio a causa della presenza di un tumore, spesso la concentrazione di ALP nel sangue è elevata.

Infatti, durante la stasi epatica o colestasi (condizioni in cui la bile anziché essere normalmente trasportata dal fegato alla cistifellea rimane all'interno del sistema epatico) la fosfatasi alcalina non viene secreta rimanendo trattenuta come idrolasi all'interno delle cellule epatiche con conseguente aumento della bile.

Normalmente quando si effettua una diagnosi clinica di epatopatia si è effettuata la palpazione al di sotto delle costole fluttuanti dove è presente la massa epatica. Quando è presente una massa infiltrante o quando è presente una colestasi tende a rigonfiare. I livelli di questo enzima aumentano significativamente, quando c'è un **blocco di uno o più condotti**. Dei marcati incrementi però sono stati osservati in tumori del fegato e cirrosi, così come l'epatite e l'utilizzo di farmaci che intaccano il fegato.

Inoltre, qualsiasi situazione che comporta una **eccessiva formazione ossea, come la malattia di Paget**, e altre condizioni come l'artrite reumatoide o qualsiasi altra situazione come la semplice frattura ossea potrà aumentare i livelli di fosfatasi alcalina.

L'altro enzima che ha la funzione di marcatore specifico di citolisi è la **γ -glutamyl transferasi (gammaGT)**. Questo enzima è capace di trasferire tra amminoacidi il gruppo glutammico ed è implicato nel recupero degli amminoacidi attraverso la membrana cellulare e nel metabolismo del glutatione.

È presente in vari tessuti: prostata, pancreas, intestino (piccole quantità) e fegato (da cui ne deriva la maggior parte). Le gammaGT hanno un valore diagnostico e prognostico per patologie a livello del fegato, anche se può trattarsi di fenomeni secondari a numerose patologie quali:

- alcolismo
- scompenso cardiaco
- colestasi (congestione delle vie biliari)
- cirrosi del fegato
- ischemia epatica
- necrosi del fegato
- epatite
- farmaci epato-tossici

Le principali patologie che determinano un aumento dei valori sono l'alcolismo, la cirrosi e le epatopatie in genere (in particolare la steatosi), alcuni farmaci (barbiturici), la pancreatite e alcune forme tumorali.

Alte concentrazioni di gammaGT creano un danno epatocellulare che rimarrà cronico e tenderà a sommare eventuali ulteriori insulti. La cronicità di questi ultimi sensibilizza l'epatocita: la secrezione di glutammato e di legami depauperano il fegato di componenti di amminoacidi a base di glutamina e lo rende più sensibile ad ulteriori stimoli tossici.

Questo enzima deve essere abbinato alla fosfatasi alcalina: le gammaGT sono presenti in vari tessuti e solo abbinandole alla fosfatasi alcalina si può avere la conferma che siano di origine epatica. e per questo risulta importante valutare entrambi gli enzimi, soprattutto in gravidanza in quanto permette di seguire lo stato epatico di donne con precedenti di alcolismo o con alterazioni virali pregresse (epatite A, che può nuocere alla gravidanza stessa).

Nel caso di marker per la capacità secretoria del fegato viene utilizzato il **sistema di coniugazione della bilirubina**. Tutto il metabolismo della bilirubina è legato a due organi completamente separati tra loro: la milza, dove viene captata e legata all'albumina e attraverso questa trasportata via sangue nel fegato (una volta che l'albumina si lega alla bilirubina questa non è più tossica), dove vengono nuovamente divise. All'interno del fegato infatti l'albumina rientrerà tra le proteine utili per il metabolismo, mentre la bilirubina verrà coniugata all'acido glucuronico tramite l'enzima UDP-glucuronil transferasi. Questo enzima trasferisce il gruppo di acido glucuronico dal substrato fosfato alla componente bilirubina. La bilirubina coniugata potrà circolare nel sangue ed essere riversata nella bile, da dove viene poi secreta per andare nell'intestino ed effettuare l'emulsione di tutti i grassi durante la fase digestiva. Durante la fase digestiva si mescola insieme agli enzimi del pancreas, effettuando la solvatazione dei lipidi e permettendo l'idrolisi da parte di lipasi e batteri intestinali. I batteri intestinali riconoscono la bilirubina coniugata all'acido glucuronico: contengono l'enzima β -glucuronidasi che taglia la componente di acido glucuronico che torna così libera al fegato per effettuare nuovamente la glucuronazione della bilirubina. Quest'ultima dopo la rimozione dell'acido viene scissa in due parti: una rimane nell'intestino e formerà la stercobilina, l'altra parte prenderà la via renale e formerà l'urobilina.

In condizioni fisiologiche la quantità di bilirubina coniugata risulta nella norma intorno ai 350 mg nell'arco delle 24h, in quanto è correlata con la distruzione dei globuli rossi. La bilirubina nasce principalmente dalla degradazione eritrocitaria ma anche da altre componenti, per cui: circa l'80% della bilirubina sarà di natura emocateretica, il 15% è data dall'eritropoiesi inefficace e il 5% ha origine epatica, che va incontro al medesimo processo degradativo.

Un eccesso di bilirubina nel sangue genera l'**iperbilirubinemia** ($>1\text{mg/dL}$), in quantità maggiori genera un quadro patologico che prende il nome di **ittero**. L'ittero non è altro che la colorazione giallastra della pelle, delle sclere e delle mucose che si manifesta quando la concentrazione di bilirubina è superiore ai 2,5 mg/dL. Quando questa concentrazione è tra 1,5 e 2,5 mg/dL si parla di **sub-ittero**.

L'ittero è una condizione parafisiologica nel neonato, mentre è frequentemente segno di patologia nell'adulto. L'ittero che si presenta negli adulti può essere di due tipologie:

- ittero emolitico, dovuto a aumentata produzione di bilirubina e/o a un'impossibilità da parte del fegato di effettuare il processo di coniugazione con acido glucuronico
L'enzima UDP-glucuronil transferasi è un enzima del fegato geneticamente predeterminato. Una ridotta attività di questo enzima causa la **sindrome di Gilbert** mentre una ridotta produzione di questo enzima causa la **sindrome di Crigler-Najjar**. La bilirubina in entrambe queste sindromi non viene glucuronata rimanendo perciò tossica.
- ittero colestatico condizione in cui la bilirubina viene normalmente prodotta, va a costituire la bile, ma questa incontra un ostacolo e non può percorrere il normale tragitto che la porterebbe nell'intestino e quindi a essere eliminata con le feci.

Una condizione simile alla sindrome di Gilbert può essere causata dal digiuno prolungato o sforzo intenso. L'elasticità della membrana dei globuli rossi diminuisce con un conseguente aumento dell'emolisi.

Tanto più un soggetto che presenta iperbilirubinemia, sub-ittero o ittero viene identificato minori saranno i danni epatici e neurologici. In laboratorio la bilirubina libera viene rilevata tramite dosaggio: la bilirubina coniugata viene prima immersa in una soluzione contenente etanolo così da liberarla di tutti i legami e viene poi dosata e sommata alla bilirubina libera del sangue. La somma di questi due valori ci permette di ottenere la bilirubina totale. E' comunque molto importante calcolare tutti i vari tipi di bilirubina perché ci consente di distinguere i vari quadri patologici del sistema biliare ed avere indicazioni a livello diagnostico o pronostico.

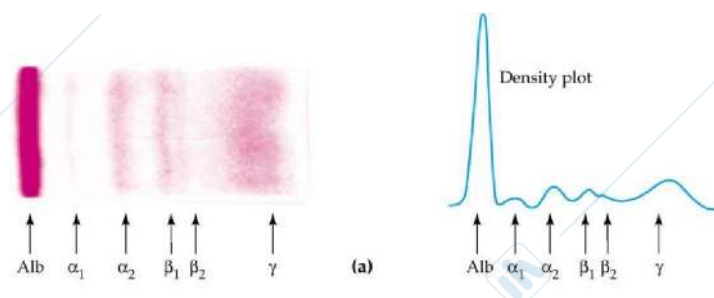
L'ittero può essere distinto in tre livelli: preepatico, intraepatico e postepatico. L'ittero preepatico è legato a ciò che avviene nella milza o per emolisi, ovvero a tutte le condizioni emolitiche o di distruzione eccessiva di globuli rossi. L'ittero intraepatico è legato alla presenza di una patologia del fegato (virale, alcolica, genetica o epatocarcinomi). L'ittero postepatico E' dato da un'impossibilità di fuoriuscita della bile nel duodeno.

La presenza di bilirubina libera circolante provoca conseguenze patologiche a livello del SNC, in particolare nuclei della base (ittero nucleare) e a livello renale per l'interferenza con il metabolismo idroelettrolitico (es. edema neuronale).

Per valutare la corretta funzionalità del fegato viene effettuata l'**elettroforesi del siero**, chiamata anche *protidogramma*, che permette di separare e, quindi, di **identificare e valutare le proteine del siero**.

Le proteine del siero sono di cinque tipi:

1. L'**albumina**
2. Le **Alfa-1-globuline**
3. Le **Alfa-2-globuline**
4. Le **Beta-globuline**.
5. Le **Gamma-globuline**



LEZIONE 12 (27/11/17 mattino)

Quando si parla di elettroforesi abbiamo visto come le frazioni sono distinte in *Albumina alfa, beta e gamma*. Nella zona dell'albumina alfa distinguiamo *alfa 1 e alfa 2* in cui ci sono le proteine della fase acuta ovvero quelle proteina plasmatiche che vengono rilasciate dal fegato in seguito ad uno stimolo infiammatorio. Nella *zona delle Beta* invece vanno a migrare quelle proteine che sono o un fattore di complemento o quelle che sono collegate con le componenti lipoproteiche delle proteine plasmatiche. Inoltre esiste una zona sfumata in cui non riconosciamo una singola banda, in questa zona si trovano le *Gammaglobuline*, esse nascono proprio dal fatto che migrano nella zona gamma della separazione elettroforetica e sono rappresentate da tutte le frazioni delle *immunoglobuline*.

Le immunoglobuline sono degli anticorpi e nascono dai linfociti di tipo B in seguito all'interazione con l'antigene, quindi con una qualsiasi cellula o componente estranea all'organismo che sia in grado di stimolare la produzione degli anticorpi. Gli antigeni (not self) attivano i linfociti B che si trasformano in plasmacellule in grado di liberare le gamma globuline. **Le gammaglobuline** sono principalmente riconosciute in cinque frazioni **IgG, IgM, IgA, IgD e IgE**. Le IgA sono chiamate secretorie, le IgG sono quelle con la memoria a lungo termine, le IgM servono per la risposta immediata anticorpale nei confronti dell'antigene, le IgD si trovano nei tessuti e le IgE sono quelle che vengono chiamate reagine, ovvero quelle che in seguito ad uno stimolo vengono rilasciate molto velocemente e vanno ad agire su alcune forme cellulari che si chiamano mast cellule rilasciando istamina e creando il reperto infiammatorio tipico delle reazioni allergiche. Queste forme possono subire a seconda del periodo una diversa distribuzione. Da un punto di vista prettamente quantitativo le più semplici da osservare e da dosare sono le IgG, le IgM e le IgA. Queste tre forme sono quelle che principalmente vengono osservate in un elettroferogramma. Tra queste 3 quella maggiormente presente è la IgG cioè la frazione degli anticorpi di memoria. Se si viene in contatto con un agente esterno si fa una prima reazione con le IgM, che sono la prima risposta di difesa, poi intervengono le IgA con la funzione secretoria di tutti i liquidi biologici che servono per la barriera immunitaria, successivamente appena diminuirà la produzione dell'immunoglobulina M aumenta la produzione dell'immunoglobulina G, quest'ultima chiamata appunto anticorpo di memoria è quella che a distanza anche di anni ci darà la difesa dall'agente patogeno originario, per questo quando siamo colpiti da una malattia in età pediatrica, in età adulta non la riprendiamo perché avremo la difesa immunitaria che ricorda l'antigene di memoria. Sulla stessa base funziona il vaccino, un agente che fa produrre anticorpi ma che non genera la malattia; in questo caso l'antigene viene degradato con il calore mantenendo la capacità di far produrre anticorpi ma senza produrre la malattia. Ci sono diverse condizioni in cui queste immunoglobuline possono essere secrete in maniera diversa ovvero l'uomo può andare incontro a condizioni di *ipogammaglobulinemie e ipergammaglobulinemie*.

Ipogammaglobulinemie → possono essere o deficit immunitari quindi un'infezione che rallenta le difese immunitarie (virus del HIV, che è un'immunodeficienza acquisita, il virus modula delle specifiche cellule linfocitarie e quindi non permette di riconoscere un agente e quindi abbattano le nostre difese immunitarie. Un altro esempio sono le neoplasie, il nostro corpo non lo combatte con gli anticorpi perché non lo riconosce come corpo estraneo).

Ipergammaglobulinemie → il sistema linfocitario di tipo B va in contro ad una iperproduzione. In questo caso si parla di iperplasia immunitaria. Si potrebbe avere un'iperplasia di ogni singolo clone delle immunoglobuline, questo significa che un solo clone può essere iper-proliferante e produrre una forma di immunoglobulina specifica che si riconosce come una **gammapatia monoclonale**. Se invece questa iperplasia colpisce tutte le forme dei cloni delle immunoglobuline quindi tutte le varie frazioni allora si parla di **gammapatia policlonale**.

Quando si ha un assetto policlonale bisogna considerare tutte le patologie sistemiche, quindi che possono coinvolgere l'intero organismo, ad esempio le patologie autoimmuni, queste non coinvolgono un solo organo, ma più organi insieme anche quelli che sono indipendenti dal sistema linfoide, cioè non sono i linfociti o le ghiandole linfatiche ad essere colpiti, quelli sono solo l'oggetto ma a monte vi sono delle patologie come la mononucleosi di tipo infettiva o delle patologie polmonari, quindi si ha un complesso sistema che viene alterato e che poi si riflette sul sistema linfoide, questo comporta l'attivazione di tutte le classi quindi un'**iperplasia policlonale**. Se abbiamo un cluster di cellule che producono le immunoglobuline di una singola classe si parlerà di gammopatia monoclonali, e distingueremo la patologia a seconda della frazione colpita. quindi si distinguerà prima di tutto l'iperproliferazione dei linfociti B, in questo caso la produzione iperplasica avviene senza uno stimolo antigenico. In questo caso si distinguono patologie benigne e maligne.

patologie benigne → vengono incluse tutte quelle associate a patologie sistemiche di tipo epatico, quando le componenti monoclonali sono intorno ai 10 g/dl sono tutte *crioglobulinemie associate ad epatopatie*, il fegato va in sofferenza produce una serie di molecole proteiche che si chiamano crioglobuline (anticorpi che precipitano al freddo). Tutte le altre condizioni di iperplasia dei linfociti di tipo B che producono anticorpi monoclonali derivano purtroppo da patologie maligne, sono alterazioni neoplastiche del sistema linfoide e tra queste ci sono i mielomi, le leucemie che colpiscono il sistema linfatico e la malattia di Waldenstrom, queste tre sono neoplasie del sistema dei linfociti B. il mieloma multiplo produce tutte le forme selezionando il clone ogni volta delle IgA e delle IgG, tranne le IgM, ciò significa che se in un elettroforesi si ottiene una gammopatia delle immunoglobuline M possiamo a priori escludere un mieloma di tipo multiplo. Quando è presente la malattia di Waldenstrom chiamata anche sindrome linfoproliferativa, si riconoscono solo le IgM, quello che caratterizza questa malattia sono proprio le catene pesanti delle immunoglobuline M. la forma più grave è la leucemia linfatica cronica. All'interno della frazione delle gamma globuline, si trova il **Fibrinogeno**.

Fibrinogeno → la sua presenza ci permette di distinguere tra plasma e siero. Se il fibrinogeno è assente della zona delle gamma noi stiamo analizzando un siero, ovvero la componente liquida dopo la coagulazione. Questo ci permette di valutare il tipo e l'efficienza del prelievo, permette di valutare anche quanto il fegato sta partecipando al sistema coagulativo. Il fibrinogeno dopo la coagulazione diventa fibrina, in particolare nel campione si troverà una forma degradata della maglia della fibrina ovvero il d-dimero esso è un piccolo frammento della maglia della fibrina dato da enzimi che tagliano la fibrina stessa. A seconda della quantità d-dimero quanto sistema coagulativo c'è stato in precedenza, una quantità alta di d-dimero significa che è avvenuta una massiva coagulazione e quindi vi è il rischio di un trombo. Per valutare se la coagulazione è avvenuta in maniera corretta vi sono dei parametri, uno di questi è la *protrombina*, da cui deriva il tempo di coagulazione che si fa avvenire in vitro, questo ci permette di capire se tutte le sostanze che sono presenti nel sistema emo-coagulativo sono presenti in quantità ottimali. Il *tempo di protrombina* è il tempo che impiega il fibrinogeno a trasformarsi in fibrina, i secondi che impiega la protrombina a diventare trombina, e quindi la trombina a tagliare il fibrinogeno in fibrina e fare la maglia coagulativa e quello che permette di valutare se tutti i fattori sono correttamente presenti all'interno del nostro organismo. Aggiungendo la tropoplasmina si riesce a indurre il passaggio della protrombina in trombina e a valutare che nell'arco di 10-15 secondi questa reazione deve avvenire, se non avviene all'interno di questo range allora esiste un problema alla coagulazione. La vitamina K è essenziale per la coagulazione, si può andare in contro o ad ipovitaminosi K o ipervitaminosi K, indicano rispettivamente dei livelli troppo bassi o alti della vitamina K, quindi indica un'alterata coagulazione, il fegato non produce un'adeguata quantità né di vitamina K né di fibrinogeno. Queste sono molecole proteiche di tipo epatico quindi un difetto di questo genere viene identificato come grave ematopatia del parenchima epatico. Quando si parla di molecole proteiche si fa riferimento alle molecole circolanti nel sangue che fungono da biomarker ovvero quelle molecole che si utilizzano per fare una diagnosi. Le molecole proteiche sono collegate con il sistema metabolico, quindi ogni volta che l'organismo introduce un contenuto consistente di azoto libero o legato, cambia anche il contenuto proteico, può essere stimolato o depauperato. Tutte queste condizioni portano a sintetizzare gli aminoacidi essenziali, portando così il metabolismo a intraprendere vie metaboliche differenti, che si chiamano cicli. Il ciclo della componente azotata è chiamato **ciclo dell'urea** dato da un sistema *ornitina/ citrullina*. Attraverso questo ciclo non si ottiene come prodotto di degradazione l'ammoniaca ma lo ione ammonio, perché altrimenti essa, nei mammiferi, sarebbe tossica. L'organismo non è in grado di degradare l'ammoniaca, per eliminare la tossicità dell'ammoniaca si sfrutta il ciclo dell'urea. Si lega una parte della componente ammoniacale che si stacca dall'arginina per formare l'ornitina trasformata in urea

Urea → formata da due porzioni di ammoniaca legate ad un carbonio centrale

Questo permette di eliminare l'ammoniaca, di legarla ad un sistema carbonioso ciclico perché l'ornitina viene formata aggiungendo un solo carbonio dall'amminoacido arginina e questo ci permette di ottenere sia a livello citosolico sia a livello mitocondriale l'eliminazione dell'ammoniaca, si produce urea che non è più ulteriormente degradabile dal nostro organismo, attraverso il sangue arriva al rene e da qui viene eliminata attraverso il sistema emuntorio urinario. Ogni volta che si controlla l'**ammoniemia** ovvero il livello di ammoniaca nel nostro organismo, questo ci dice quanto è alterato il metabolismo proteico. Ogni volta che esiste un quadro anche minimo dello ione ammonio nel sangue questo porta a gravi problemi di tossicità, soprattutto a livello cerebrale, ma anche a livello epatico e muscolare. Il livello di ammoniaca può aumentare con le diete iper-proteiche.

AMMONIEMIA:

L'ammoniemia è utile in caso di sospetta encefalopatia epatica (alterazioni neurologiche conseguenti a grave insufficienza della funzionalità epatica e/o cortocircuiti venosi fra vena porta e circolo sistemico).

L'aumento dell'ammoniemia può essere determinato da:

- diminuita sintesi di urea da parte del fegato per alterata funzionalità metabolica o per cortocircuiti venosi
- aumentata formazione di ammoniaca ad opera di batteri intestinali per metabolismo proteico (eccesso nella dieta, proteine di origine ematica come sanguinamento intraluminale da varici venosi, etc..)

Ogni volta che esiste una patologia collegata al fegato la parte ammoniacale non viene trasformata in urea, portando quindi a danni tipici del fegato andando incontro a *epatosplenomegalia*, ovvero l'ingrossamento contemporaneo del fegato e della milza. La mancata degradazione dell'ammoniaca inoltre comporta anche malattie cerebrali creando encefalopatia, infine si potrebbe anche andare in contro a danni oculari e letargie ovvero senso di stanchezza.

FISIOLOGIA CARDIACA

Il cuore è alla base del nostro sistema circolatorio, è un muscolo involontario che ha una caratteristica di contrattilità e di autonomia diverso da qualsiasi altra massa muscolare. La componente muscolare è striata diversa dalla striata scheletrica proprio perché è caratterizzata dalla sua capacità contrattile involontaria. Ha una ritmicità regolata da un sistema autonomo.

Il cuore viene distinto in destro e sinistro da un setto:

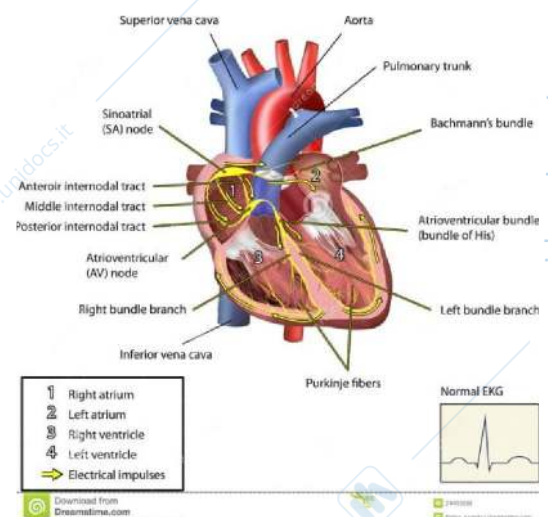
Due metà indipendenti: **cuore destro e cuore sinistro**.

Ogni metà comprende due cavità: **atrio** (superiore, cubico) e **ventricolo** (inferiore, conico) comunicanti tramite l'**orifizio atrioventricolare**.

Mentre i due atri e i due ventricoli sono separati tra di loro mediante due setpimenti (setti interatriale e interventricolare), i due orifizi atrioventricolari, destro e sinistro, sono provvisti di valvole cuspidali (rispettivamente **valvola tricuspide e valvola mitralica**) che permettono il passaggio del sangue dalle cavità atriali a quelle ventricolari e si oppongono invece al reflusso dai ventricoli agli atri.

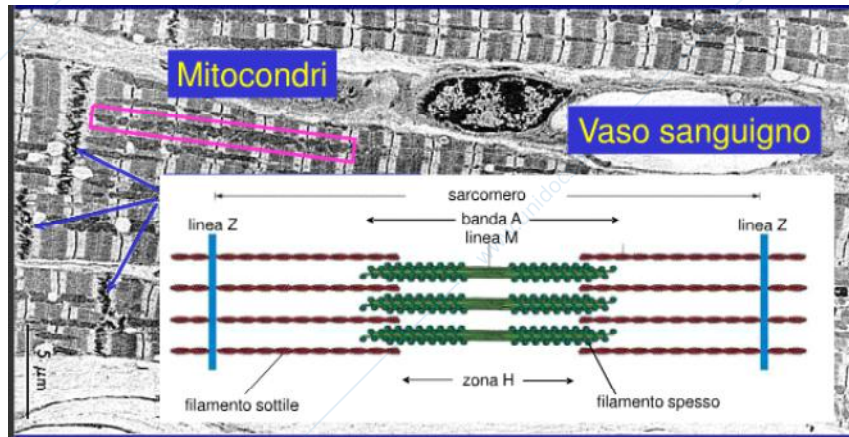
Normalmente non esiste una connessione tra il cuore destro e quello sinistro altrimenti si verrebbe a formare una fessurazione, l'unico caso in cui si può avere una connessione è tra gli atri e i ventricoli attraverso il dotto di botallo o forame pervio. La massa muscolare del ventricolo è più consistente di quella dell'atrio. Esistono delle condizioni che permettono al sangue di avere un'unidirezionalità, il percorso è dalla periferia verso l'atrio, poi verso il ventricolo e infine di nuovo verso la periferia. Non c'è mai una condizione di reflusso, e questo è regolato attraverso le valvole tricuspide e mitralica. L'intera condizione circolatoria è diversa durante l'arco della vita dell'individuo. Come muscolo esso stesso deve essere irrorato dal sangue e questo avviene grazie alle coronarie. Il muscolo cardiaco è composto da due sistemi:

Miocardio comune → fibrocellule muscolari striate atriali e ventricolari, dotate di capacità contrattile simile alle fibrocellule muscolari scheletriche. Le cellule hanno la striatura che caratterizza le fibre di actina e miosina, un nucleo, queste fibre sono saldate l'una con l'altra in modo da avere il sincizio delle cellule muscolari, e la fusione di queste cellule creano una massa che si contrae tutta insieme. Il sincizio è fatto da gap junction, in modo che permette alle cellule di essere separate ma funzionalmente legate fra di loro. Ci sono delle strie particolari che si



chiamano **dischi intercalari**, queste saldano in maniera irreversibile le cellule tra di loro, in modo che tutto il ventricolo si contrae.

Miocardio specifico → fibrocellule autoeccitabili (tessuto nodale) e fibrocellule che si organizzano nel sistema di conduzione del cuore (tessuto di conduzione), per trasmettere la contrazione dal miocardio specifico al miocardio comune. Tessuto involontario con contrazione ritmica e automatica. Questo è caratterizzato da cellule che hanno la capacità dell'auto eccitabilità creando l'impulso della contrazione, tutto ciò che rientra nel sistema nervoso vegetativo involontario è in grado di controllare la ritmicità del muscolo cardiaco. La ritmicità porta ad un'alternanza di diastole (decontrazioni) e sistole (contrazioni). Ci sono tre componenti fondamentali del sistema cardiaco: il **nodo seno-atriale** (atrio destro), **nodo atrio-ventricolare** (posto tra atrio e ventricolo destro) da cui partono i **fasci di His** che si trovano nella componente centrale dei due ventricoli. Questi due fasci abbracciano tutta la massa muscolare dei due ventricoli. I fasci di His si diramano formando le **Fibre del Purkinje**, queste fanno nella singola fibrocellula, in modo che tutta la massa del ventricolo si contraiga con un micro stimolo.



Nel muscolo cardiaco non si produce acido lattico, quindi non esiste un sistema anaerobio. La contrazione funziona nello stesso modo in cui funziona la contrazione del muscolo scheletrico, quindi avremo le linee Z, il sarcomero che è l'unità funzionale, la banda A che è quella di distanza della zona M, e i filamenti spessi e sottili di actina e miosina. Lo scivolamento dei piani fa incrociare le striature trasverse, i filamenti di actina e miosina scivolano l'uno sull'altro, questo fa accorciare la fibra, così avviene la contrazione e la decontrazione. Nel muscolo cardiaco solo il 20-30% di glucosio viene consumato, mentre il 70% dell'energia deriva dai lipidi ovvero dal metabolismo della beta-ossidazione (non avviene la trasformazione dell'acido piruvico in acido lattico per l'arresto della contrazione). Nel muscolo cardiaco ci sono altre 3 molecole essenziali per una contrazione efficace:

- Troponina T: responsabile del legame del complesso tropomiosinico (essenziale per legame tra actina e miosina)
- Troponina C: lega il calcio (supporto contrattivo)
- Troponina I: inibisce l'ATPasi actomiosinica

Il rilascio delle troponine viene dosato nel sangue perché è il biomarker di un danno cardiaco. Il dosaggio della troponina T è il più sensibile per un danno cardiaco.

Il cuore riceve il sangue (a bassa pressione) dalle vene e lo pompa nelle arterie (ad alta pressione). In questo modo il sangue giunge ai tessuti dove, attraverso l'endotelio dei capillari, possono avvenire gli scambi necessari al mantenimento delle attività metaboliche cellulari (ossigeno).

Il **piccolo circolo (polmonare)** è alimentato dal ventricolo destro e porta il sangue venoso agli alveoli, per consentire gli scambi tra O₂ e CO₂; tutto il sangue passa nel circolo polmonare prima di giungere nel sistemico.

Il **grande circolo (sistemico)** è alimentato dal ventricolo sinistro e porta sangue ossigenato dal circolo polmonare a tutti i tessuti.

Quindi riusciamo a distinguere un circolo arterioso da uno venoso. L'arterioso cede ossigeno e sostanze nutritive ai tessuti e da essi assume anidride carbonica e scarti diventando così venoso. Questo avviene nei distretti capillari, essi sono sempre periferici. I vasi sanguigni che trasportano il sangue venoso si differenziano da quelli che trasportano il

sangue arterioso. Visto che la spinta cardiaca è data dalla contrazione del ventricolo di sinistra, tutte le arterie hanno una componente elastica molto presente e poca quella muscolare, perché devono avere l'elasticità di dilatarsi al passaggio del sangue dopo la contrazione, al contrario invece sarà quando dal distretto venoso deve risalire al cuore perché il sangue deve risalire. La parte più interna di ogni vaso sanguigno è rivestita dalla cellula endoteliale, queste cellule sono attaccate l'una alle altre, la giunzione cellulare di queste cellule è fenestrata in modo da avere scambio da plasma e matrice ma anche per dare la disponibilità di passare a componenti cellulari. L'endotelio è un sistema attivo e tutte le disfunzioni di questo sono alla base delle malattie circolatorie, come l'aterosclerosi.

L'ATEROSCLEROSI

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica delle arterie di grande e medio calibro che coinvolge gli elementi della risposta immunitaria, le cellule dei vasi e le lipoproteine plasmatiche.

Questa patologia è caratterizzata da una placca che è un sistema complesso in cui nella porzione sotto l'endotelio, i macrofagi vanno a digerire proteine e lipidi che l'individuo non è in grado di degradare, i lipidi ossidati vengono mangiati dai macrofagi che non essendo in grado di degradarli si trasformano in cellule schiumose, si accumulano sotto l'endotelio e danno origine alla placca, che può crescere fino a chiudere il vaso arterioso. La placca aterosclerotica provoca vari gradi di ostruzione del flusso sanguigno (stenosi). Decorre in modo silenzioso e asintomatico per molti anni e, quando colpisce, il danno è scarsamente recuperabile. Tutto questo porta ed un fenomeno apoptotico e infiammatorio.

3 componenti fondamentali della placca:

- **Cellule:** VSMC e monociti/macrofagi/cellule schiumose di provenienze ematica;
- **Fibre:** matrice di tessuto connettivo e detriti cellulari;
- **Lipidi:** lipoproteine plasmatiche e colesterolo

Ci sono dei parametri che possono essere utili per controllare le alterazioni di questo fenomeno. Se la placca è composta anche dalle piastrine può dar vita ad un trombo, le micro-trombosi se si trovano nei capillari possono creare anche delle ischemie ovvero un minor afflusso di sangue e di sostanze nutritive, se a quel distretto non arriva sangue va incontro ad ipossia (mancanza di ossigeno) e quindi a necrosi (rottura cellulare, quindi si perde la funzione di quell'organo). Le molecole principalmente coinvolte sono le apolipoproteine, tra di loro quelle più sbilanciate sono le apoB e le apoC, le apoB legano tutte le LDL ossidate e le depositano nei macrofagi dando origine all'ateroma. Le apoC invece vanno ad attivare le lipoproteine lipasi cioè il fenomeno opposto ovvero quello che degrada la molecola lipidica. Questo bilanciamento è indispensabile. Quando si parla di LDL e di HDL (colesterolo cattivo e buono) si parla in realtà di apoB e di apoC, le apoC sono all'interno delle HDL, degradano le componenti lipidiche, mentre le apoB sono quelle che le legano.

Le apolipoproteine:

- Interagiscono con recettori cellulari che determinano il destino metabolico delle lipoproteine
- Agiscono come attivatori e inibitori degli enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico
- Piu importanti: apoA, apoB, apoC, apoE (*allele apo E4 legato ad Alzheimer*).

Questo sistema metabolico risiede nel fegato, deriva dall'intestino e interviene anche il pancreas. Il sistema intestinale assorbe tutto ciò che noi introduciamo, più introduciamo quantità di grasso saturo più questo verrà assorbito come componente che può essere ossidato. Se questa alimentazione non viene correttamente bilanciata da un sistema antiossidante tanto più possono essere ossidabili e quindi tendono a depositarsi nelle arterie. Nonostante le lipasi del pancreas le componenti ossidabili possono arrivare alle arterie.

Fattori di rischio cardio vascolari

Tutti i fattori che possono essere alterati e che possono dare un'indicazione alla propensione di un soggetto per una malattia cardio-circolare. Tra i vari fattori ci sono le dislipidemie ovvero tutte le alterazioni del metabolismo lipidico

di cui le LDL, le HDL e i trigliceridi sono le principali componenti. Altri fattori sono: il fumo, l'ipertensione, il diabete, stress emotivo, esercizio fisico e stato ormonale.

Tabella 8.1
Fattori di rischio cardiovascolare

Fattori di rischio cardiovascolare tradizionali
Dislipidemia
Fumo
Iipertensione
Insulino-resistenza e diabete
Scarso esercizio fisico ed obesità
Stress emotivo
Stato ormonale (estrogeni)
Nuovi fattori di rischio cardiovascolare
Omocisteina
Fibrinogeno
Lipoproteina (a)
Indici di funzione fibrinolitica (PAI-1, lisi del coagulo, D-dimero)
Indici di infiammazione (hs-PCR, ICAM-1, IL-6)

LEZIONE 12 pomeriggio

I fattori predisponenti su cui è necessario focalizzare l'attenzione per minimizzare il rischio di avere patologie cardiovascolari sono rappresentati da: assetto lipidico (colesterolo HDL e LDL, trigliceridi), omocisteina (fattore di rischio perché direttamente collegato con i fattori ipertensivi), lipoproteina A piccola, proteina C reattiva (PCR), tutte le sottoclassi delle LDL e le isoforme APO E.

I parametri di rischio cardiovascolare possono essere valutati attraverso metodi ELISA (colorimetrici e enzimatici accoppiati).

APO E

Le ApoE (Apolipoproteine E) sono una classe di proteine coinvolte nel metabolismo dei lipidi. Queste proteine stanno suscitando molto interesse dal punto di vista della ricerca e dal punto di vista clinico: ad esempio la capacità recettoriale dell'ApoE 3 è correlata alla capacità di scavenger delle sostanze lipidiche all'interno dell'organismo (più è elevata la capacità recettoriale maggiore è la capacità di scavenger).

Una popolazione italiana di una città che prende il nome di Limone sul Garda presenta un numero di abitanti limitato che presentano il recettore delle Apo A (Apo A-1) iperespresso: questa condizione dovuta ad una mutazione è responsabile del ridotto (quasi nullo) rischio cardiovascolare di questi soggetti.

Quando si va a valutare il discorso delle lipoproteine l'approccio diventa molto complesso e specifico. Infatti per la valutazione di tutte le diverse forme delle molecole che vogliamo prendere in esame bisogna prendere in considerazione sia quelle libere sia quelle associate a proteine e colesterolo.

ASSETTO LIPIDICO

Quello che viene definito assetto lipidico (trigliceridi, colesterolo HDL e LDL e le frazioni alterate) deriva anche dalle abitudini alimentari del soggetto: una persona che segue una dieta ricca di grassi saturi tenderà ad avere molti più trigliceridi e LDL rispetto d una persona che fa del sano movimento continuativo nel tempo.

Ogni fattore considerato possiede un range di valore che rappresenta i valori di normalità. Al di sopra di questi valori si stabiliscono due limiti di fattore di rischio predisponente.

Il colesterolo totale, ad esempio, deve essere inferiore a 200, all'interno di questo parametro poi le HDL devono superare i 45 mentre le LDL devono essere avere un valore di prevenzione primaria sotto al 130.

Questi valori vanno ad indicare un valore di prevenzione primario oltre il quale non bisogna andare, esistono però anche valori di prevenzione secondari che hanno lo scopo di abbassare ulteriormente il livello primario: più basso è il valore maggiore è la prevenzione del rischio.

I fattori preventivi sono quelli più lontani dai valori elevati che circolano: il valore massimo è quello che si consiglia di non superare (superando il livello massimo inizia un fattore di rischio).

Il rischio varia da moderato ad alto tanto più i valori si innalzano al di sopra del valore soglia.

L'OMS (organizzazione mondiale della sanità) ha stabilito quali sono i valori normali che non devono essere superati. Se siamo al di sopra anche di uno solo di questi parametri del profilo lipidico il quadro è patologico (se ovviamente ripetuto in più analisi e non occasionalmente). Se i valori sono nella norma e ripetuti rimangono tali si possono fare analisi di check-up ripetute annualmente o biennialmente.

Se si ha un quadro simil-patologico questo dovrebbe essere maggiormente valutato tenendo conto dei range: basso rischio se i parametri non sono oltre il 30° percentile o il 50° percentile; superiore al 50° percentile diventa un quadro a rischio alto.

In presenza di condizioni a basso o alto rischio si ripetono le analisi per fare ulteriori indagini come valutazioni di laboratorio per le patologie cardiache o dei profili epatici come le transaminasi. In caso di basso rischio si importa un regime dietetico da valutare in un tempo limitato al fine di identificare se la causa della dislipidemia è legata a abitudini alimentari o se è di origine familiare.

Condizioni a rischio ripetute nel tempo vengono trattate attraverso il mantenimento di un regime dietetico associato a terapie farmacologiche che hanno lo scopo di riportare tutti i valori alla normalità.

Se nonostante le terapie continuano ad essere presenti alterazioni non è opportuno lasciare che la condizione vada avanti nel tempo: più una condizione anomala si protrae nel tempo più l'infiammazione correlata aumenta con la conseguente progressione della malattia. Vanno quindi presi in considerazione tutti gli altri parametri come le transaminasi del fegato, le troponine e le CK (creatinfosfochinasi) del sistema cardiaco.

Attraverso il dosaggio delle CK viene effettuata una diagnosi di infarto del miocardio.

OMOCISTEINA

L'omocisteina è un semplice amminoacido solfonato (contiene cisteina all'interno che permette di creare i legami disolfuro) che deriva dalla metionina attraverso un fenomeno di demetilazione. Gli amminoacidi possono sia subire demetilazione in cui viene rimosso un gruppo metilico sia deaminazione in cui viene rimosso un gruppo amminico. Questi processi di modifica permettono di arrivare ad avere amminoacidi essenziali necessari alla sintesi delle proteine a partire da amminoacidi non essenziali.

Infatti, mentre l'omocisteina non è presente in natura la metionina è presente in tante fonti.

L'omocisteina crea dei legami SH-SH che fanno ripiegare la molecola creando un riarrangiamento della proteina. Il ciclo di formazione tra metionina e omocisteina è dato da un passaggio di un ciclo metabolico che prende il nome di ciclo del folato (o ciclo dell'acido folico). In particolare il passaggio avviene ad opera di un enzima che prende il nome di MTHFR (metilidrotetrafolato) capace di rimetilare o transulfurare (due passaggi di quel ciclo) l'omocisteina e la metionina.

Un eccesso di omocisteina provoca la formazione di accumuli tossici per l'organismo. L'omocisteina accumulata non riesce a legarsi sufficientemente con l'albumina per andare in circolo aumentando anche il rischio di legare la sostanza sull'endotelio vascolare favorendo fenomeni trombotici.

Se un soggetto presenta omocisteina elevata (iperomocisteinemia) l'introduzione di acido folico alla dieta riporta i valori nella norma. L'iperomocisteinemia (HHcy) si riduce grazie a vitamine del gruppo B (B6, B12 e folati) che sono in grado di convertirla in metionina.

L'omocisteina ha un ruolo principe nei danni vascolari:

- La sua elevata reattività porta alla produzione di ROS con la conseguente perossidazione lipidica, formazione delle "foamcells" e proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari.

- Provoca la riduzione della produzione endoteliale di ossido nitrico, ad azione vasodilatatoria e regolatore della funzione piastrinica.
- La sua presenza in eccesso favorisce la desquamazione endoteliale esponendo il subendotelio a sostanze procoagulanti del sangue
- Provoca la produzione endoteliale di trombomodulina andando a ridurre l'attività anticoagulante della proteina C.

L'iperomocisteinemia può essere dovuta a diverse cause: carenze di enzima o carenze di eliminazione.

Valori di riferimento Omocisteina

Normali: < 13 $\mu\text{mol/L}$

Moderatamente elevati: 13-60 $\mu\text{mol/L}$

Severamente elevati: > 60 $\mu\text{mol/L}$

PROTEINA C REATTIVA

Altro fenomeno importante è quello dell'infiammazione. Non essendo possibile fare il dosaggio di tutte le citochine infiammatorie viene effettuato il dosaggio di un'unica proteina chiamata proteina C reattiva (PCR) che a diverso grado di disponibilità la ritroviamo in soggetti con un precoce stadio infiammatorio di una patologia vascolare.

La proteina rilasciata nel plasma permette di valutare la velocità e l'intensità con la quale avviene il rolling leucocitario. È infatti chiamata una proteina della fase acuta ovvero di una fase in cui il reperto infiammatorio sta progredendo. La PCR va sotto lo stimolo della IL-6 e quello che ci permette di osservare è che tanto più l'endotelio presenta questa proteina maggiore è il rolling leucocitario verso i lipidi ossidati. Viene dosata attraverso sistemi di nefelometria o immunoenzimatici con diversi gradi di sensibilità per cui si può fare una correlazione tra i livelli di proteina C reattiva e il rischio cardiovascolare.

Se è inferiore ad 1mg/L si ha un basso rischio, se è presente tra 1-3 mg/L il rischio è medio, se è maggiore di 3 mg/L si ha un alto rischio di malattia cardiovascolare.

ABBINANDO I DOSAGGI DI TUTTI I FATTORI DI RISCHIO POSSONO ESSERE MESSE IN EVIDENZA PARTICOLARI CONDIZIONI.

LIPOPROTEINA A PICCOLA

Un'altra molecola che viene dosata spesso in laboratorio è la lipoproteina a piccola. La lipoproteina (a) piccola è una glicoproteina simile al plasminogeno che presenta una parte lipoproteica a bassa densità sintetizzata dal fegato che risulta essere la componente di legame tra la APO B100 e APO A

I livelli di questa proteina presentano variabilità inter-individuale in quanto i livelli dipendono dal genotipo apo(a). Plasminogeno e apo(a) consistono in una regione serin-proteasica e numerosi anelli a tripli ponti disulfidrici denominati **kringles**. Il legame del plasminogeno con la fibrina tramite i kringles 1 e 4 è necessario per compiere la fibrinolisi plasmina-mediata. L'apo(a) contiene una sola copia del kringle 5 simile al plasminogeno e numerose copie del kringle 4 che comprende, invece, regioni inattive simili al sito di legame della fibrina.

La Lp(a) attraversa l'endotelio e resta intrappolata a livello della tonaca intima (soprattutto nelle aree in cui è già presente un danno di parete). La sua presenza aumenta la formazione di foam-cell, aumenta la proliferazione della muscolatura liscia, l'infiammazione e l'instabilità della placca aterosclerotica. La Lp(a) inoltre compete con plasminogeno impedendo la formazione di plasmina, impedendo quindi la fibrinolisi e causando trombi. Il rischio cardiovascolare associato ad alti livelli di Lp(a) è di tipo esponenziale:

Livelli intermedio-bassi → rischio poco aumentato

Livelli alti → rischio molto aumentato

IPERTENSIONE ARTERIOSA

L'ipertensione arteriosa è un disturbo della circolazione sanguigna caratterizzato dall'aumento stabile della pressione arteriosa, cioè della forza esercitata dal sangue sulle pareti delle arterie. La pressione sanguigna è dovuta alle pulsazioni del cuore, che normalmente generano una spinta, o pressione, sufficiente a far scorrere il sangue in tutto il corpo. La pressione sanguigna normale a riposo è compresa tra i 100 e i 140 mmHg di sistolica e tra i 60 e i 90 mmHg di diastolica, nell'ipertensione, invece, tale spinta è superiore alle normali esigenze dell'organismo arrivando a una pressione pari o superiore ai 140/90 mmHg

CATEGORIE	SISTOLICA	DIASTOLICA
OTTIMALE	<120	<80
NORMALE	120-129	80-84
NORMALE-ALTA	130-139	85-89
GRADO 1	140-159	90-99
GRADO 2	160-179	100-109
GRADO 3	≥180	≥110
IPERTENSIONE SISTOLICA ISOLATA	≥140	<90

L'ipertensione viene classificata come primaria (essenziale) o come secondaria. Circa il 90-95% dei casi sono classificati come "ipertensione primaria", il che significa che vi è pressione alta senza evidenti cause mediche di base. Il restante 5-10% dei casi, classificati come "ipertensione secondaria" sono causati da altre malattie che colpiscono i reni, le arterie, il cuore o il sistema endocrino.

Circa il 40% della popolazione adulta e il 60-80% popolazione anziana soffrono di ipertensione arteriosa.

Alla base della regolazione della pressione arteriosa c'è il sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRAA). Questo è un sistema ormonale che viene attivato dalle cellule renali in seguito a determinati stimoli. Le cellule renali attivate producono la renina: un enzima capace di convertire un peptide inattivo, l'angiotensinogeno, in angiotensina I. L'angiotensina I viene poi convertito a sua volta in angiotensina II dall'enzima di conversione dell'angiotensina I o ACE (dall'inglese angiotensin-converting enzyme), presente principalmente a livello dei capillari polmonari.

L'angiotensina II è un ormone deputato al controllo pressorio agendo a livello cardiovascolare come attivante cardiaco aumentando la forza della contrazione e la frequenza dei battiti.

Prorenina → Renina → Angiotensinogeno → Angiotensina I → Angiotensina II

L'aumento della pressione arteriosa non causa disturbi immediati, se non in presenza di complicanze cardiovascolari e viene per questo definito "Killer silenzioso".

Esistono due tipi di conseguenze generate dall'ipertensione arteriosa:

- Conseguenze di natura pressoria (ipertensione, encefalopatia, emorragie cerebrali, dissecazione aortica, scompenso cardiaco, insufficienza renale)
- Conseguenze di natura aterosclerotica (trombosi cerebrale, infarto miocardico, angina pectoris, arteriopatie)

L'ipertensione non è una malattia ma un rischio cardiovascolare che può essere dovuta a diverse cause. La sua presenza insieme ad altri fattori di rischio può essere significativa di situazioni patologiche e per questo motivo la sua diagnosi risulta molto importante. In base alla natura del disordine vengono utilizzati test differenti per effettuare la diagnosi:

- Ipertensione essenziale è diagnosticata attraverso un insieme di test: non sono note le cause dell'ipertensione primaria perciò viene diagnosticata per esclusione dell'ipertensione correggibile.
- Ipertensione da farmaci è diagnosticata attraverso la positività all'interno dell'organismo di farmaci simpaticomimetici, corticosteroidi, mineralcorticoidi, vasopressina o cocaina.

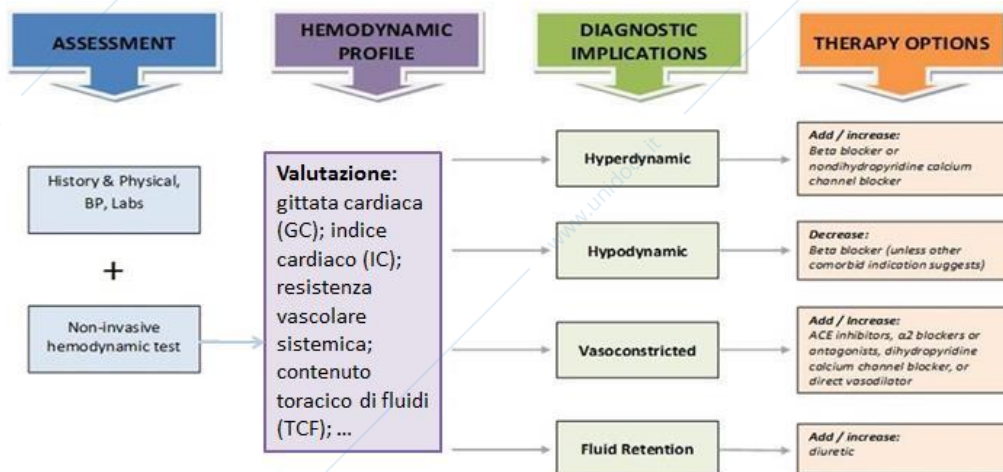
L'ipertensione viene diagnosticata sulla base di una pressione arteriosa persistentemente elevata. Tradizionalmente, ciò richiede tre misurazioni intervallate nell'arco di un mese. La valutazione iniziale del paziente iperteso deve includere una anamnesi completa e una visita medica.

Una volta che viene fatta la diagnosi di ipertensione, si tenta di identificarne la causa sottostante, basandosi sui fattori di rischio e sugli altri sintomi, se presenti. L'ipertensione primaria o essenziale è più comune negli adolescenti e presenta molteplici fattori di rischio, tra cui l'obesità e una storia familiare di ipertensione. Possono essere effettuati test di laboratorio per identificare le possibili cause dell'ipertensione secondaria e per determinare se l'ipertensione ha cagionato un danno al cuore, agli occhi e ai reni. Prove supplementari per il diabete e per i livelli

di colesterolo sono di solito eseguiti in quanto queste condizioni sono ulteriori fattori di rischio per lo sviluppo di malattie cardiache e possono richiedere un trattamento.

La creatinina sierica viene misurata per valutare la presenza di malattia renale, che può essere sia la causa sia il risultato dell'ipertensione. La creatinina sierica associata ad altri parametri può fornire una misura di base della funzionalità renale che può essere utilizzata per monitorare gli effetti collaterali di alcuni farmaci antipertensivi. L'elettrocardiogramma (ECG) viene eseguito per verificare la presenza di elementi di prova che il cuore sia sottoposto ad alta pressione sanguigna. L'ECG può anche mostrare se c'è ispessimento del muscolo cardiaco (ipertrofia ventricolare sinistra) o se il cuore ha subito un disturbo lieve. Una radiografia del torace o un ecocardiogramma possono essere eseguiti per cercare segni di ingrossamento del cuore o eventuali danni.

Esiste un algoritmo utilizzato per il trattamento anti-ipertensivo basato sulla valutazione dell'anamnesi familiare in associazione a test emodinamici non invasivi come: gittata cardiaca, indice cardiaco, resistenza vascolare sistemica, contenuto toracico di fluidi, ecc.



Gittata cardiaca: quantità di sangue espulso da ciascun ventricolo in 1 minuto. Nell'uomo adulto, a riposo, è di circa 4 - 6 L/min

Indice Cardiaco-IC = GC/SUPERFICIE CORPOREA; il suo valore normale è di 2,5 - 4 L/min/m²

TFC: traccia i cambiamenti del contenuto di fluidi. È misurato leggendo l'impedenza ad un impulso elettrico che attraversa la cassa toracica.

VASCULITE

Tutto il sistema di vasi sanguigni può essere soggetto a **vasculite**. La vasculite è un processo infiammatorio su base autoimmunitaria a carico delle pareti di arterie di diverso calibro che può determinare alterazioni a livello del flusso ematico e danni a carico dei vasi.

Le vasculiti possono essere classificate in base alla grandezza del vaso dove si mostrano gli effetti predominanti:

- vasculite dei piccoli vasi, che comprende il manifestarsi in arteriole, capillari e venule;
- vasculite dei vasi medi, che colpisce soprattutto le arterie di medio calibro;
- vasculite dei grandi vasi, che coinvolge l'aorta e le sue diramazioni principali.

Possono essere anche classificate in base alla patogenesi:

- granulomatose: Granulomatosi di Wegener, Arterite di Takayasu, Sindrome di Churg-Strauss, arterite temporale (a cellule giganti o di Horton), vasculite isolata del SNC
- da immunocomplessi: Poliarterite nodosa classica (PAN), Poliangiote microscopica (PAM), malattia di Kawasaki, Porpora di Schonlein-Henoch, Lupus eritematoso sistemico, vasculite crioglobulinemica, sindrome di Goodpasture

Ognuna di queste tipologie di vasculite può essere valutata in laboratorio, in primo luogo per identificare se le cause sono infettive o non infettive, in secondo luogo per identificare quale tipo di vasculite è presente nel soggetto.

Ad esempio in caso di vasculiti non infettive:

Disordine vasculittico	Vasi infiammati	Test di laboratorio clinico
Arterite (temporale) a cellule giganti	Aorta e arterie grandi e medie	VES elevata nella maggior parte dei pazienti
Arterite di Takayasu	Aorta e arterie grandi e medie	VES elevata nella maggior parte dei pazienti; BUN, creatinina ed analisi delle urine per definire e monitorare la malattia renale
Poliarterite nodosa	Arterie grandi e medie; piccole arterie senza coinvolgimento polmonare o glomerulare	I casi possono essere divisi in quelli di origine infettiva ed ANCA negativi e quelli non associati con infezioni e ANCA antimieloperossidasi positivi
Malattia di Kawasaki	Arterie da grandi a medie; piccole arterie	I test di laboratorio non sono informativi per la forma autolimitata della malattia; se sopravvivono complicazioni cardiache, possono essere utili i test per il danno del muscolo cardiaco (vedere Capitolo 9)
Granulomatosi di Wegener	Piccole arterie, arteriole, capillari, venule, vene	ANCA Antiproteinasi 3 rilevabili nella maggior parte dei pazienti con malattia attiva; una minore percentuale ha ANCA antimieloperossidasi
Sindrome di Churg–Strauss	Piccole arterie, arteriole, capillari, venule, vene	ANCA Antimieloperossidasi rilevabili nella maggior parte dei pazienti; eosinofilia
Poliangite Microscopica	Piccole arterie, arteriole, capillari, venule	ANCA antimieloperossidasi (più comune) o ANCA antiproteinasi 3 (meno comuni) rilevabili nella maggior parte dei casi; BUN, creatinina ed analisi delle urine per definire e monitorare le anomalie renali
Porpora di Henoch–Schönlein	Arteriole, capillari, venule	BUN, creatinina e analisi delle urine per definire e monitorare le anomalie renali

La maggior parte delle vasculiti sono ANCA dipendenti. Gli ANCA (anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili) costituiscono un gruppo di autoanticorpi, prevalentemente del tipo IgG, diretti contro antigeni situati nel citoplasma dei granulociti neutrofili (il tipo più numeroso di globuli bianchi) e dei monociti.

È sufficiente un dosaggio di questo anticorpo per prevenire le vasculiti ANCA-dipendenti, patologie sempre più diffuse tra tutti coloro che sono sedentari e che presentano patologie metaboliche

TROMBOSI VENOSA PROFONDA

La trombosi venosa profonda è un disordine caratterizzato dalla formazione di trombi in qualsiasi segmento del sistema venoso profondo. Con una conseguente alterazione del sistemaemocoagulativo, fibrinolitico.

Nel 1856, il patologo tedesco Rudolph Virchow postulò che la trombosi venosa fosse il risultato dell'interazione di tre processi, ora conosciuti come «triade di Virchow»:

- diminuzione del flusso sanguigno (stasi venosa),
- un'aumentata tendenza alla coagulazione del sangue (ipercoagulabilità)
- alterazioni a carico delle pareti dei vasi sanguigni.

Diverse patologie aumentano il rischio di trombosi venosa profonda, tra cui il cancro, traumi e la sindrome da anticorpi antifosfolipidi; altri fattori di rischio includono l'età avanzata, interventi chirurgici pregressi, lunga immobilizzazione (come con il riposo a letto, gessi ortopedici e voli di lunga durata), uso di contraccettivi orali, gravidanza, puerperio e altri fattori genetici, come un gruppo sanguigno non O.

La malattia si presenta con alcuni particolari segni clinici come: arto aumentato di volume; dolore, edema, iperestesia; alterazione colorito cutaneo (eritematoso, a volte cianotico, cute lucida); reticolo venoso superficiale; dolore da dorsiflessione piede.

La diagnosi e la prevenzione sono possibili grazie alla presenza di vari parametri, uno per ogni tipo di fattore di rischio. Gli individui sospettati di soffrire di trombosi venosa profonda possono essere valutati usando una regola di previsione clinica come il punteggio di Wells; può anche essere utilizzato anche il dosaggio del D-dimero per aiutare la diagnosi o per segnalare la necessità di ulteriori indagini. La diagnosi è più comunemente fatta grazie all'ecografia delle vene sospette.

Il trattamento della TVP avviene attraverso l'uso di:

- Farmaci anticoagulanti (eparina)

- Farmaci fibrinolitici/trombolitici: attivatore del plasminogeno tissutale (TPA)
- Filtri cavali (inseriti nell'addome all'interno della vena cava). I filtri vengono anche chiamati "ombrelli" perché assomigliano all'intelaiatura metallica degli ombrelli.
- Calze elastiche a compressione graduata. Aiutano a prevenire il gonfiore causato dalla trombosi. La compressione diminuisce le probabilità che il sangue ristagni e si coaguli.

LEZIONE 13

SINDROME CORONARICA ACUTA

La **sindrome coronarica acuta** è la manifestazione clinica più grave della malattia aterosclerotica delle coronarie. Nei soggetti affetti da questa patologia, le arterie coronarie (vasi che forniscono sangue al cuore) sono ristrette o ostruite. Di conseguenza, il cuore non riceve un afflusso adeguato di sangue e di ossigeno. La limitazione (causata da una placca aterosclerotica) del circolo sanguigno e di tutto ciò che ne consegue, come ad esempio un minor apporto di ossigeno e nutrienti, porta alla **cardiopatia ischemica o ischemia**.

L'ischemia è una riduzione di afflusso caratterizzata da una sofferenza cardiaca, il muscolo va in debito metabolico. Un quadro più complesso sarà caratterizzato non solamente dall'occlusione o sub-occlusione ma dalla presenza, nel momento in cui si ha un restringimento del lume, di un aumento della vorticosità del sangue derivante dalla sub-occlusione dell'arteriola che stessa. Questa condizione è definita come alterazione emo-dinamica e favorisce l'aggregazione piastrinica e quindi la formazione di trombi. La formazione della placca aterosclerotica e l'aggregabilità sono strettamente correlate.

Questi differenti aspetti oltre che dal punto di vista clinico si riflettono anche dal punto di vista metabolico, bisogna tener conto di ciò quando si andranno ad analizzare i bio-marcatore, come ad esempio per quanto riguarda il **danno miocardico** ovvero la lesione della cellula miocardica con conseguente lisi e rilascio di sostanze nel torrente ematico. È necessario tenere presente anche del fenomeno trombotico perché maggiore è la possibilità trombotica maggiore sarà il danno miocardico/ischemico.

Il restringimento potrà verificare un effetto occlusivo generando quindi una condizione di ipossia oppure in condizioni peggiori l'infarto.

Le sindromi coronariche acute, vengono classificate in 3 manifestazioni in base ai criteri clinici, elettrocardiografici e dei markers cardiaci ematologici:

- **IMA Q (infarto miocardico con soprasslivellamento del tratto ST):** occlusione completa e stabile del vaso coronarico. Presenta la caratteristica elevazione degli indici di necrosi miocardica e alterazioni elettrocardiografiche.
- **IMA non Q (infarto miocardico senza soprasslivellamento del tratto ST):** occlusione incompleta o temporanea del vaso coronarico. Gli indici di necrosi miocardica sono superiori alla norma, ma manca il caratteristico quadro elettrocardiografico dell'infarto.
- **Angina instabile:** i markers biochimici, in presenza o meno di variazioni elettrocardiografiche, sono normali.

Una distinzione molto efficace può essere fatta a livello biochimico, perché se è presente necrosi miocardica la cellula si lisa e rilascia il proprio contenuto questo implica la presenza o l'assenza di un marcatore che livello biochimico è in grado di caratterizzare l'eventuale lisi oppure di escluderla. I marcatori sono caratterizzati dal tempo trascorso dall'evento, tanto più è precoce l'evento tanto meno noi avremo probabilità di dosarlo, tanto più invece risulterà lontano l'evento tanto più precocemente riesco a fare una valutazione del danno metabolico.

Quando si è anatomicamente certi di un IMA si avrà la totale occlusione di una coronaria per quella zona cardiaca, quindi quella zona del cuore non riceverà più nutrimento ed ossigeno andando incontro ad una spontanea necrosi che sarà dunque irreversibile, ovvero quella parte del cuore muore (condizione visibile nel tempo perché la zona interessata non risponderà più in maniera corretta ad un elettro cardiogramma).

Esiste un effetto temporale scandito all'incirca da 20 minuti: se il dolore toracico dura meno di 20 minuti si ha a che

fare con l'angina pectoris, se il dolore rimane clinicamente persistente per più di 20 minuti si ha a che fare con l'infarto miocardico acuto.

L'angina pectoris è una condizione in cui vi è una sofferenza a causa di una sub-occlusione. Si manifesta mediante un dolore toracico improvviso correlato al cuore che si verifica di solito a riposo o in seguito ad un modesto sforzo fisico. Può anche essere accompagnata da dolore al braccio o l'avambraccio sinistro. Il dolore è causato da una riduzione del sangue che circola in quella zona ponendo il cuore in una condizione di debito non riuscendo più a pompare né ossigeno né nutrienti andando così in sofferenza cardiaca. Queste manifestazioni cliniche in genere sono autolimitantesi e non durano per più di 20 minuti ma tendono a ripetersi più volte nell'arco della stessa giornata.

Se non curato questo tipo di danno può progredire e non essere più temporalmente limitato: il vaso coronarico tende a chiudersi totalmente non permettendo più il passaggio del sangue (mancanza di ossigeno e nutrienti) e si andrà incontro ad un danno irreversibile e l'infarto.

Dalla differenza tra un'occlusione parziale ed un'occlusione totale si avrà un quadro clinico differente a seconda della patologia. Le differenze a livello biochimico sono dettate dalla differenza delle condizioni metaboliche del muscolo cardiaco durante un'angina o un infarto, nel caso di un'angina pectoris si avrà una condizione di ipossia, mentre nel caso di un infarto si avrà invece una condizione di anossia.

L'ipossia del cardiomiocita (singola unità funzionale del cuore) genera una inibita produzione di ATP e un'inibizione dei meccanismi di trasporto in quanto limita tutto ciò che fa consumo di ATP (tutto ciò che doveva essere trasportato attraverso le membrane risulterà fermo all'interno della cellula). L'inibizione dei meccanismi di trasporto causa l'arresto dello scambio degli ioni potassio e magnesio. La liberazione degli ioni potassio crea un'alterazione della funzione contrattile del muscolo stesso che andrà incontro ad un'ipocontrazione (diminuzione dei battiti cardiaci) con conseguente deficit di attività metabolica generale.

Il cuore per il 90% sfrutta il metabolismo lipidico solo in minima parte sfrutta il metabolismo glucidico, poiché sfruttando troppo il metabolismo glucidico formerebbe troppo piruvato ed in condizioni anaerobiche formerebbe troppo acido lattico che creerebbe un arresto muscolare. Lavorando in anaerobiosi, inoltre, si acidifica il PH all'interno del sistema cardiaco.

Tutte queste condizioni portano alla necrosi ovvero alla morte della cellula miocardica nel settore in cui non viene irrorato il sangue, questo comporta una lisi con successivo rilascio dei marker interni alla cellula nel sangue. Per cui prelevando del sangue periferico in un soggetto affetto da tale disturbo possiamo trovare ciò che normalmente è nella cellula miocardica all'interno del torrente sanguigno.

Nel caso di infarto conclamato il tessuto va incontro a necrosi per anossia generando un arresto di tipo contrattivo muscolare.

Esistono dei **fattori predisponenti** alla malattia **non influenzabili**, come la predisposizione familiare, l'età e il sesso maschile, ma anche dei **fattori di rischio modificabili**, come la dislipidemia (> colesterolo totale, > LDL, >TAG, < HDL), l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, la sindrome metabolica, l'obesità, il tabagismo, l'aumento di Lp(a), l'iperfibrinogenemia (> 300 mg/dL), gli anticorpi antifosfolipidi e la sedentarietà.

Sono molto importanti da considerare anche i **fattori scatenanti** della malattia, occasionali (non prevedibili) e non legati ad una condizione predisponente, rappresentati da: sforzi violenti, stress con variazione della pressione arteriosa, angina instabile (rischio di IMA del 20%), ritmi circadiani (il 40% di tutti gli infarti avvengono tra le 6-12 del mattino, probabilmente connesso con il picco del cortisolo e l'innalzamento dei valori della PA).

Questi fattori alterano in maniera istantanea e repentina il metabolismo: ad esempio, uno sforzo violento genera un'eccessiva pressione all'interno del vaso arterioso che se presenta una condizione di lume ridotto può provocare un danno endoteliale. Un altro è quello del ritmo circadiano, il rapporto sonno-veglia è molto importante per il rilascio di un ormone (cortisolo) e se presente in quantità elevate favorisce il soggetto ad avere un infarto. Da uno studio sui ritmi circadiani si è visto che il 50% degli infarti avviene nelle prime ore del mattino (06:00-08:00) perché in quella fascia oraria il ritmo circadiano immette la maggiore quantità di cortisolo tramite la corteccia del surrene.

Ogni volta che vi è un fenomeno di necrosi la componente elettrica dell'elettro cardiogramma viene alterata, questo perché tutte le zone che vanno incontro a necrosi perdono l'attività contrattile, che è l'attività monitorata mediante l'elettrocardiogramma. Se non identificata in tempo la zona in necrosi diventa una componente fibrotica che tende a dilatarsi e ad aumentare la pressione del soggetto. La pressione ventricolare elevata nel cuore genera una **cardiomiopatia dilatativa**, condizione più pericolosa post infarto, che se non controllata dal punto di vista pressorio può portare alla dissecazione della aorta o del ventricolo.

MARKERS DI LESIONE MIOCARDICA

Quando parliamo di **markers di lesione miocardica** si prendono in esame delle molecole che hanno un risvolto dal punto di vista clinico in questa particolare condizione.

Normalmente tutte queste molecole sono caratteristiche della cellula miocardica, quindi queste sostanze in condizioni fisiologiche sono presenti all'interno di ogni cardiomiocita. Le sostanze di cui parliamo sono: troponina I e T, mioglobina, CK e la sua isoforma MB.

Quindi ogni volta che c'è una rottura delle cellule miocardiche queste sostanze che normalmente non dovrebbero essere presenti nel sangue, eccetto per la CK (cheratin-chinasi) presente anche nei muscoli scheletrici, saranno presenti nel torrente ematico.

È per questo importante distinguere tra un evento occasionale ed un evento che scaturirà l'infarto, per far ciò dobbiamo tenere presente il **sistema di stratificazione del rischio** ovvero dobbiamo creare la condizione in cui al di sotto di un determinato range il rischio sia minimo ed assolutamente indicativo se supera una certa soglia. Importante nella stratificazione e nell'affidabilità del risultato non è solo la positività del risultato stesso ma anche la quantità, maggiore è il danno maggiore sarà la quantità del marcatore e tanto più ci saremo allontanati dall'episodio poiché quando si verifica l'episodio si ha un rilascio minimo, più passa il tempo maggiore sarà il danno e maggiore sarà il rilascio del biomarcatore nel sangue.

Per sapere quanto tempo è trascorso da un infarto o un'angina si effettuano due analisi, qualitativa e quantitativa. Quando si valuta un'angina l'elettrocardiogramma perde possibilità diagnostica in quanto l'infarto può essere di tante ridotte dimensioni che non generano un'alterazione elettrica e quindi la variabilità dell'elettro cardiogramma è completamente assente, l'angina instabile potrà quindi non essere completamente vista.

Ogni volta che si ha una lisi cellulare ho un rilascio di tutto ciò che ho all'interno della cellula, compresi enzimi come proteasi e idrolasi che, ogni qualvolta vengono rovesciate all'esterno della cellula, tagliano tutte le molecole ed i diversi prodotti come ad esempio le proteine. Questo è importante perché ad un basso range di PH questi enzimi vanno incontro ad attivazione autocatalitica e divenendo capaci di tagliare i marcatori come ad esempio CK, troponina e qualsiasi altra sostanza che può essere degradata proteoliticamente, questo implica una difficoltà nel riconoscere i marcatori. In laboratorio questo può essere risolto utilizzando il test ELISA che riconosce, con un anticorpo altamente specifico, un frammento della molecola, denominato epitopo.

Ogni molecola proteica è costituita da più componenti (componente carbossilica, ammino terminale e varie componenti interne) che vengono riconosciute da alcuni anticorpi generati dal sistema immunitario che vengono poi utilizzati nel sistema ELISA. Se però l'anticorpo dovrebbe riconoscere qualcosa di frammentato proteoliticamente, quindi eliminato dal sistema, l'anticorpo non riuscirà più a riconoscerlo quindi quando costruisco un anticorpo monoclonale per fare un test io devo sempre sapere la conservazione dell'epitopo. Un epitopo conservato è in grado di mantenere la sua capacità antigenica (generare un anticorpo) anche dopo che è stato metabolicamente modificato e questo mi darà affidabilità nel saggio ELISA. Più il dosaggio ELISA si basa su un anticorpo che è in grado di riconoscere un anticorpo conservato, migliore sarà l'affidabilità, la specificità e la sensibilità del nostro test.

Ogni volta che analizziamo questi marker dobbiamo sapere cosa accade a questi marker durante un danno, sapere ad esempio se un marker viene rilasciato in condizione di infarto piuttosto che di angina, diversificare un danno reversibile da un danno irreversibile perché in questo modo posso dare una terapia e vedere se danno è rientrato attraverso la modulazione di questi marker. Ogni volta che un paziente entra con un sospetto di infarto si immette un sistema in grado di lisare gli eventuali trombi che si sono formati (la terapia trombolitica o fibrinolitica diventa

indispensabile) e avrò dunque bisogno di verificare anche minime variazioni, quindi tanto più è sensibile e specifico tanto più sarà affidabile il test.

Un solo marcatore non è sufficiente a soddisfare tutte le caratteristiche per questo si avrà di bisogno di un pannello di marcatori, ovvero un profilo fatto di diverse molecole proteiche che fra di loro ci danno un quadro migliore. Il problema maggiore anche dal punto di vista laboratoristico è l'ora, il momento dell'insorgere, perché io dovrò comprendere dalla qualità, dalla quantità e dal sistema del pannello dei marcatori se il soggetto l'ha avuto nell'esatto momento in cui è entrato, se l'ha avuto prima o se lo avrò dopo.

Nel caso il disturbo sia antecedente al ricovero io devo capire quante ore prima è avvenuto perché se è avvenuto in un lasso di tempo molto lungo io devo poter consigliare una terapia adeguata: se successo 12 ore fa ad esempio effettuerò una trombolisi mentre la fibrinolisi sarà efficace in un lasso di tempo compreso fra le 1-2 ore.

Il primo fattore che sarà visibile in seguito ad un danno miocardico acuto è la mioglobina, seguita dalla CK perché è l'enzima che permette la contrattilità del muscolo ed infine le troponine.

TROPONINE

Negli anni 2000 furono utilizzati i marcatori di elezione che sono le **troponine**, 3 molecole che hanno un ruolo solo nella cellula muscolare attiva, presenti in 3 forme: C, I, T.

Queste tre forme cooperano tra di loro per la contrazione della fibrocellula muscolare cardiaca (cardiomiocita) che presenta caratteristiche diverse dal miocita scheletrico. In quest'ultimo le cellule sono legate fra loro solamente da giunzioni che formano le fibre. Nel muscolo cardiaco, i cardiomiociti, sono delle cellule saldate attraverso dei dischi intercalari che formano un sincizio cioè tutte le cellule fra di loro sono saldate e la contrazione avviene in modo omogeneo: ad esempio, il ventricolo si contrae tutto in modo uniforme e allo stesso momento, il sincizio stesso permette alle cellule di contrarsi rapidamente e contemporaneamente grazie alla presenza intra-cellulare delle troponine.

La troponina C lega il calcio permettendo la contrattilità muscolare, la troponina I ha effetto inibitorio, ovvero inibisce il legame tra miosina e actina per far avvenire la contrazione, e la troponina T serve da ancoraggio e lega actina e miosina. Se nel sangue troviamo circolanti le troponine il danno sarà sicuramente miocardico, in quanto queste sono tessuto specifiche. Quello che impedisce che il test sia funzionale al 100% è la quantità minima rilevabile (picogrammi/L): piccole quantità permettono di valutare lesioni recenti ma se non possono essere rilevate bisogna aspettare che trascorri del tempo dalla lesione alla rilevazione.

Importante è inoltre l'emivita di queste molecole in quanto il sangue è filtrato dal rene e nel tempo queste molecole saranno degradate, da ciò scaturisce il **tempo di positività** ovvero la finestra temporale, espressa in ore, in cui io ho la certezza che se è presente il marcatore allora sarà presente anche il danno. L'ACME è il periodo di tempo nel quale noi troviamo i valori più alti di troponine all'interno del sangue. Questi possono variare da uno a due giorni, in un soggetto che due giorni prima ha avuto un infarto effettuando un dosaggio ritrovo i livelli di troponina specifica per quel danno ancora alti. Le proteasi sono in grado di degradare la troponina, questo però generalmente non accade e posso quindi effettuare dei dosaggi seppur a distanza di giorni. Sarà molto importante abbinare il livello delle troponine con il livello degli altri marcatori perché questo permette di aumentare ulteriormente specificità e sensibilità di un eventuale danno.

N.B: le troponine non chiariscono se il meccanismo della sofferenza sia dovuto a ischemia o IMA

CREATINCHINASI

La **creatinchinasi (CK)**, chiamata anche **fosfochinasi (CPK)**, è un enzima che appartiene alla classe delle transferasi. La sua funzione consiste nel catalizzare la trasformazione della creatina a fosfocreatina, consumando ATP e liberando energia chimica.

La reversibilità della reazione permette di liberare energia sotto forma di ATP sfruttando la defosforilazione della fosfocreatina.

La CK (creatin-chinasi) è un enzima dimerico di cui si riconoscono tre subunità responsabili della formazione di 3 isoenzimi:

- CK1 → CK-BB (cervello), assente nel siero in condizioni fisiologiche
- **CK2 → CK-MB (muscolo cardiaco)**, in condizioni fisiologiche rappresenta il 2% delle CK sieriche
- CK3 → CK-MM (muscolo scheletrico), in condizioni fisiologiche rappresenta il 10% delle CK sieriche

Ogni isoforma è localizzata in uno specifico tessuto: se noi durante un'analisi presentiamo anticorpi contro quelle specifiche forme di CK noi possiamo riconoscere l'effetto o l'eventuale danno all'interno di un sistema tissutale. Ad esempio, se troviamo la CK-MM insieme alla mioglobina sarà un danno a carico del muscolo scheletrico, se invece troviamo la CK-BB sarà una stroke e quindi il cervello è andato in necrosi a causa di un'alterazione, se è presente la CK-MB è elevata la probabilità che la componente delle strutture miocardiche sia andata incontro a lisi.

Quando parliamo di stress ossidativo uno dei fenomeni peggiori è quello da **riperfusione post-ischemica**: quando si verifica un'ischemia abbiamo la restrizione di un vaso che porta meno nutrimento ed ossigeno (condizione di ipossia), se durante questo fenomeno il cuore immette con una pressione più alta eseguendo una vaso dilatazione si ottiene una riperfusione del tessuto e quindi una maggiore quantità di ossigeno rispetto all'ambiente ipossico iniziale. Se non si riperfonde il tessuto in maniera corretta potrà verificarsi o un danno da stress ossidativo oppure un errore della riperfusione ed il tessuto rimarrà ipossico andando così incontro ad insofferenza metabolica presentando un danno accumulato.

MIOGLOBINA

La mioglobina è una proteina globulare la cui funzione specifica è quella di legare reversibilmente l'ossigeno. La sua struttura è simile a quelle delle subunità dell'emoglobina condividendo lo stesso *fold* (*globin fold*), ma ne differisce nella funzione in quanto ha un'affinità per l'ossigeno sei volte superiore (caratteristica dovuta soprattutto alla sua natura non cooperativa) e non è una proteina allosterica.

Parliamo di una molecola proteica che è tipica di tutte le forme muscolari, possiamo dunque trovarla nella cellula cardiaca sia in quella scheletrica striata. E' una molecola proteica trasportatrice di ossigeno all'interno del muscolo quindi tutti i muscoli la presentano.

Quando si ha un danno a carico di queste cellule, essendo la quantità di mioglobina all'interno molto elevata, la quantità di mioglobina rilasciata sarà molto alta per cui è facile da dosare. Essendo presente in quantità così elevate può inoltre evidenziare un danno precoce nella cellula muscolare: nell'arco di due ore se la mioglobina si alza so che si è già verificato un danno muscolare (non sappiamo però se cardiaco o scheletrico).

La mioglobina è inoltre soggetta ad una forte degradazione proteolitica si innalza nell'arco delle 18 ore ma 6 ore dopo questa potrà essere degradata proteoliticamente e la sua presenza potrà risultare nulla.

VANTAGGI E SVANTAGGI DEI DIVERSI TEST

Il dosaggio della CK ha il vantaggio di essere un dosaggio semplice, molto economico ed è estremamente rapido (effettuabile in circa 10 minuti) questo ne permette un uso di routine per monitorare nel tempo, ad esempio un soggetto che ha avuto un infarto, poi si è ripreso e nuovamente ha un infarto (re-infarto) è facile da seguire tramite la CK (SCOPAVA DURO – CIT GIULIO) questa, infatti, tende ad abbassarsi ed innalzarsi spontaneamente con il passare del tempo ed un suo successivo innalzamento ci suggerisce un re-infarto.

La mioglobina ha il vantaggio della grandissima quantità con questo marcatore si adopera per esclusione in quanto può essere di due tipi muscolare scheletrico o muscolare miocardico. Lo svantaggio è che la mioglobina è rapidamente persa attraverso le urine ed è degradata velocemente attraverso le proteasi e quindi avrà un rapido ritorno a valori normali, questo implica che va dosata in tempo.

La troponina ha una capacità elevatissima di aiutare nella stratificazione del danno, basso livello=danno lieve, livelli alti=danno molto più esteso, inoltre presenta un'elevata specificità (solo miocardica) ed un'elevata sensibilità (già all'interno delle 3 ore avrà picogrammi rilevabili). Presenta inoltre un aumento esponenziale e rapido rispetto alla crescita del danno.

MARCATORI SECONDARI

Esistono altri marcatori che sono in una fase di transizione tra lo studio preclinico dei laboratori di ricerca e quella di attuazione nel sistema di un laboratorio.

I peptidi natriuretici sono ormoni peptidici che inducono natriuresi, ovvero un aumento dell'eliminazione di sodio attraverso le urine.

Tra questi vi sono:

- il **peptide natriuretico atriale (ANP)**, prodotto dalle cellule muscolari degli atri cardiaci;
- il **peptide natriuretico cerebrale (BNP)**, prodotto principalmente nei ventricoli cardiaci, sebbene inizialmente isolato dal tessuto cerebrale di suino

Il **Peptide natriuretico atriale (ANP)** è prodotto da cellule specializzate del miocardio. L'ANP è coinvolto nel controllo omeostatico di acqua, sodio, potassio e grasso presenti nell'organismo. Viene rilasciato in seguito ad un eccessivo aumento del volume ematico (alta pressione sanguigna) da particolari miociti, nell'auricola destra del cuore.

Il **peptide natriuretico cerebrale (BNP)** è secreto dai ventricoli del cuore in risposta ad un eccessivo allungamento delle cellule muscolari del cuore (cardiomiociti). Poiché le azioni di BNP sono mediate dai recettori ANP, gli effetti fisiologici di BNP sono identici a quelli dell' ANP.

L'effetto netto di questi peptidi è una diminuzione della pressione sanguigna dovuta alla diminuzione della resistenza vascolare sistemica. Inoltre, le azioni di entrambi comportano una diminuzione della gittata cardiaca a causa di una diminuzione complessiva della pressione venosa centrale a seguito della riduzione del volume del sangue che segue alla natriuresi e diuresi.

Il legame tra recettore-agonista provoca una riduzione del riassorbimento renale del sodio, che si traduce in una diminuzione del volume del sangue.

PANCREAS

Il **pancreas** è una voluminosa ghiandola annessa all'apparato digerente. Esso è formato da una parte **esocrina** e una **endocrina**. La sua principale funzione è quella di produrre **succo pancreatico** (prodotto dalla parte esocrina), **insulina** e **glucagone** (entrambi prodotti dalla parte endocrina). Il succo pancreatico ha la funzione di digerire alcune sostanze nell'intestino tenue, mentre l'insulina ed il glucagone hanno come principale funzione quella di controllare la concentrazione di glucosio nel sangue.

Il pancreas è un organo unico ed impari che si trova nel mediastino sinistro del nostro organismo, avrà quindi la parte centrale della testa rivolta verso il centro del nostro addome sottosternale e la coda verso il lato sinistro del nostro corpo. La coda si trova in una zona anatomicamente vicina alla milza ma non hanno alcun tipo di correlazione, la testa invece alloggia nell'ansa del duodeno (la parte iniziale dell'intestino) che è collocata dopo la valvola pilorica dello stomaco.

Questa sede è anatomicamente indispensabile per far sì che il succo pancreatico possa andare nella zona del duodeno e creare immediatamente il primo passo della digestione. Tutto ciò che viene prodotto durante la digestione deve essere neutralizzato portando il pH a valori di normalità, il secreto gastrico (acido fluoridrico) è a pH 2 per questo è necessaria una neutralizzazione consistente. La neutralità avviene tramite la secrezione di un succo pancreatico che contiene elevatissime quantità di bicarbonato che tampona l'acidità ed evita così la presenza di componenti acide nel duodeno.

Se la iperacidità gastrica arriva anche al duodeno si possono avere **ulcere gastroduodenali** cioè la componente acida dello stomaco arriva nel duodeno dove crea lesioni dello stesso.

Il succo pancreatico sarà importante non solo per neutralizzare il PH acido che arriva dallo stomaco ma anche perché è il primo passo per poter iniziare la vera fase di digestione alimentare: nel punto in cui si ha il secreto pancreatico si ha anche il secreto della bile da parte della cistifellea, questo punto è chiamato **ampolla di Vater** in cui convergono il dotto pancreatico ed il dotto del coledoco. Questo è molto importante perché la cistifellea secerne la bile, emulsionante dei grassi, che rende i grassi idrosolubili e successivamente questi giungono al pancreas dove vengono aggrediti dagli enzimi in grado di degradare i lipidi tramite le lipasi.

Il succo pancreatico contiene una quantità elevata di enzimi idrolitici, glicolitici e proteolitici in grado di digerire tutte le componenti alimentari ed effettuare realmente la digestione per poi andare avanti con l'assorbimento. Bisogna tenere presente che la componente anatomica del pancreas è fatta da lobi, al cui interno ci sono dei dotti che terminano negli acini del pancreas (cellule acinose) che hanno la capacità nella parte apicale di secernere il secreto pancreatico (enzimi, bicarbonato) tramite secrezione di natura apocrina.

Il pancreas è l'unico organo endocrino ad avere due funzionalità, esocrina ed endocrina. La differenza tra le zone endocrine ed esocrine all'interno del pancreas è dettata dalla loro capacità secretiva, il pancreas esocrino è costituito da acini mentre la parte endocrina è fatta di cellule pancreatiche che riversano il loro secreto nei vasi sanguigni e non nel duodeno come la parte esocrina.

La parte endocrina è quindi sempre una parte secretiva costituita da cellule particolari che riversano il secreto direttamente nel torrente sanguigno. Le sostanze prodotte dalle cellule endocrine del pancreas sono gli ormoni. La parte endocrina rappresenta dall'1 al 3 % dell'intero organo ed è costituita dalle **isole di Langherans**. Queste isole sono agglomerati di cellule endocrine che producono il secreto ormonale direttamente nel torrente sanguigno (gli ormoni più prodotti sono generalmente l'insulina e il glucagone).

Nelle isole di Langherans si possono riconoscere 4 forme cellulari differenti al proprio interno:

- le **cellule α** che secernono il glucagone, ormone che ha effetto nell'innalzamento della glicemia;
- le **cellule β** che sono maggiormente presenti, rappresentano circa il 70% degli isolotti di Langherans e secernono insulina, ormone ipoglicemizzante (abbassa la concentrazione di glucosio nel sangue);
- le **cellule Δ** che secernono l'ormone della crescita, la **somatostatina**, che serve a far comprendere alle cellule quando devono proliferare o stare quiescenti,
- le **cellule f** (<1%) che hanno la capacità di secernere particolari polipeptidi di segnalazione tipici del pancreas stesso.

Intorno all'isolotto di Langherans sono presenti gli acini del pancreas esocrino, l'unione di queste componenti (isolotti di Langherans, cellule escocrine ed endocrine) sono inframezzate dallo **stroma del pancreas**, ovvero il **parenchima**, costituito da collagene, fibre vasi ect. Il paraenchima dà la forma, la consistenza e la struttura stessa del pancreas. All'interno dello stroma sono presenti vasi linfatici, vasi sanguigni, arteriosi e venosi che possono avere un ruolo molto importante.

Prendendo in esame il pancreas esocrino notiamo che è costituito da acini pancreatici, cellule uguali con stessa capacità secretiva di componenti indispensabili per la digestione, in cui possiamo riconoscere acqua, bicarbonato ed enzimi. Gli enzimi all'interno del succo pancreatico sono: gli enzimi amilolitici che degradano gli amidi tra cui il più importante è l'**amilasi**, gli enzimi lipolitici che servono per la digestione nel tratto duodenale di tutte le componenti lipidiche (**lipasi e fosfolipasi**) e le proteasi che si distinguono in due importanti famiglie, quella che taglia esternamente la proteina (**esopectidasi**) e quella che taglia internamente la proteina (**endopeptidasi**).

E' inoltre presente un'altra classe enzimatica, gli enzimi nucleolitici che degradano gli acidi nucleici (**desossiribonucleasi e le ribonucleasi**) in grado di digerire sia l'RNA che il DNA.

Gli enzimi presenti nel succo pancreatico vengono secreti come enzimi inattivi e successivamente trasportati in tutto il dotto giungendo così nel duodeno dove vengono poi attivati (necessario perché solo nel duodeno gli enzimi devono agire proteoliticamente, lipoliticamente oppure nucleoliticamente). L'attivazione avviene tramite la **proteolisi limitata** cioè la capacità da parte di alcuni enzimi di attivare gli enzimi più potenti. In particolare l'enterochinasi

dell'intestino trasforma il tripsinogeno in tripsina e quest'ultima è l'enzima proteolitico più potente presente nel nostro organismo in grado di attivare tutti gli altri enzimi. Senza la tripsina tutti gli altri enzimi pancreatici rimarrebbero cozimogeni, quindi il tripsinogeno del pancreas deve arrivare nel duodeno in cui attiva la tripsina tramite la fosforilazione indotta dall'enterochinasi ed infine la tripsina attiverà a cascata tutti gli altri enzimi pancreatici.

Il pancreas e la cistifellea secernono il succo pancreatico e la bile solamente durante il fenomeno digestivo, attraverso le contrazioni peristaltiche della parete dello stomaco. Ogni volta che si introduce qualcosa nello stomaco questo viene rimescolato con il succo gastrico e le varie altre componenti mediante contrazione. Il controllo della secrezione pancreatico è mediata dagli ormoni gastro-intestinali e dal sistema nervoso (fibre colinergiche del nervo vago).

Durante la fase contrattiva sequenziale negli strati muscolari le fibre nervose (nervo vago) che innervano sia il pancreas sia la cistifellea, secernono due ormoni: la **gastrina**, ormone prodotto dallo stomaco che controlla la secrezione pancreatico esocrina ed endocrina, la **secretina**, che stimola la secrezione di acqua e bicarbonato a livello duodenale, e la **colecistochinina-pancreozimina**, che viene secreta dal duodeno e stimola la secrezione di bile e succo pancreatico.

La produzione di **somatostatina**, una volta terminata la digestione, inibisce la secrezione pancreatico.

DANNI AL PANCREAS

La **pancreatite** è un malattia infiammatoria del pancreas. Sulla base di criteri temporali può essere classificata come:

- Pancreatite **acuta**
- Pancreatite **cronica**

In caso di pancreatite acuta vengono alterati i rapporti anatomo-funzionali quindi l'anatomia del pancreas si altera, gonfiandosi e alterando la funzione di secrezione del pancreas stesso. La pancreatite acuta è un'anomala attivazione degli enzimi che comporta un'autodigestione.

Nel caso di danno acuto avremo un secreto pancreatico alterato, le cui componenti specifiche si riversano nel sangue (non dovrebbero esserci). Ritroviamo queste componenti in quanto in caso di pancreatite acuta le cellule vengono lisate e liberano il proprio contenuto nel plasma.

In caso di pancreatite cronica invece, il danno consiste in un insulto protratto nel tempo che causa **cambiamenti morfologici irreversibili** della ghiandola. Questi cambiamenti a loro volta causano dolore cronico e **perdita permanente della funzione pancreatico**. Il danno alle cellule pancreatiche porta quindi ad avere un rallentamento funzionale, producendo meno secreto ed enzimi. Questa condizione prende il nome di **insufficienza pancreatico**. Questa condizione comporta un difetto nella digestione, che non avviene in maniera corretta: non vengono digeriti lipidi, proteine e glucidi (con conseguente dimagrimento da insufficienza pancreatico) e ciò comporta un danno che si chiama **cachessia**.

Trascurare la cachessia da insufficienza pancreatico comporta la morte.

La pancreatite acuta è causata da un attivazione errata degli enzimi zimogeni nel pancreas (attivazione fisiologica nel duodeno) che digeriscono il pancreas stesso, avviene quindi una degradazione autocatalitica del pancreas.

Questo comporta segni laboratoristici e clinici molto evidenti come ad esempio il dolore emigastro, nausea, pallore e tachicardia. Quello che avviene è un reperto infiammatorio seguito da edema ed emorragia con successiva necrosi del tessuto che rilascia gli enzimi nel sangue. Sono proprio gli enzimi riversati nel sangue che verranno utilizzati tramite il dosaggio nel sangue come biomarker per una pancreatite di tipo acuto.

Le cause più frequenti sono disordini del tratto biliare ed alcolismo acuto e cronico. Per cronicità si intende un insulto che può portare ad avere un danno acuto nel pancreas o un abuso cronico dell'alcool (rappresenta il 75% dei casi).

Le pancreatiti acute sono legate al fenomeno infiammatorio: quando si verifica uno stimolo, di qualunque natura esso sia (virale, alcolico ect.), questo genera un infiltrato infiammatorio di leucociti, vengono liberate citochine infiammatorie e così si attiva l'enzima all'interno del pancreas (tripsinogeno) che attiva tutti gli altri enzimi presenti e

che vanno ad agire sul pancreas stesso. Questo comporta la necrosi del tessuto del pancreas, in particolare del parenchima, che genera emorragie perché vengono distrutti i vasi presenti all'interno e si crea uno shock per perdita di liquidi e sangue all'interno della struttura stessa.

Quando analizziamo la condizione cronica, invece, si osserva che la pancreatite di tipo cronico ha dei cambiamenti che non sono dati da lisi cellulare bensì da un'infiammazione che dura nel tempo cambiando la morfologia degli acini del pancreas. Questo comporta un cambiamento della funzionalità dell'acino che avrà di conseguenza una funzionalità ridotta (produrrà meno secreto, meno componenti importanti per la digestione). Le cause possono essere ad esempio l'alcolismo cronico e l'ipertrigliceridemia ovvero quei soggetti che hanno costantemente un'alterazione dei lipidi all'interno del proprio sistema ematico.

Le conseguenze sono: un secreto più viscoso che, insieme al bicarbonato, genera dei calcoli (che ostacolano il deflusso calcificando le pareti e il sistema del parenchima) e ipertensione. Il pancreas lavorerà molto meno provocando una calcificazione ed una successiva fibrosi e di conseguenza problemi metabolici di natura sia esocrina sia endocrina.

MEZZI IDENTIFICATIVI IN LABORATORIO

L'unico mezzo identificativo per una pancreatite acuta per ora è la diagnosi istologica effettuata con una infiltrazione leucocitaria nel pancreas stesso.

LEZIONE 13 (POMERIGGIO)

OMEOSTASI DEL GLUCOSIO

Parlando di omeostasi del glucosio si prende in esame il **sistema di controllo del mantenimento del glucosio**, sia intracellulare sia extracellulare, che si basa su un complesso sistema di enzimi e di ormoni.

Ogni volta che mobilizziamo il sistema del glucosio interferiamo con le funzioni del fegato, tutto ciò che noi eliminiamo dal fegato entra nel circolo plasmatico e si verifica così un'iperlipidemia.

Questo meccanismo ci permette di ottenere a livello circolatorio l'innalzamento del monomero di glucosio che otteniamo da una depolimerizzazione del glicogeno nel fegato.

Il glucosio messo in circolo può però essere metabolizzato in diversi modi per ottenere sia il fenomeno ossidativo (utilizzato da parte delle cellule muscolari) e anche per produrre, attraverso vie laterali di vie metaboliche, particolari componenti lontane dal glicogeno che possono essere utilizzate per fare componenti amminoacidiche, grasse e proteiche.

Il profilo giornaliero varia dai 70 ai 100 mg/dl, la variabilità dipende dal tipo di contesto: attività fisica, attività notturna, attività mnemonica e cerebrale. È importante che la soglia non superi i 100 mg/dl o che non scenda al di sotto dei 70 mg/dl perché in tutte le condizioni in cui questi valori vengono ad essere modificati si hanno condizioni di alterato metabolismo. Quando il glucosio supera la soglia dei 100 mg/dl oppure scende al di sotto dei 70 mg/dl, subentra il fenomeno di deposito o di interconversione, nel primo caso il monomero viene accumulato sotto forma di glicogeno epatico e da qui utilizzato a seconda della necessità, l'altra è l'interconversione eseguita tramite vie metaboliche parallele quindi metabolismo degli acidi grassi, beta ossidazione o quello amminoacidico nel caso questi ultimi possano essere utilizzati per fare proteine o via metabolica glucidica.

ORMONI

Gli ormoni sono una classe di molecole che agiscono in quantità estremamente ridotte e modulando un'attività molto specifica. L'innalzamento o la diminuzione del glucosio all'interno del nostro organismo è controllato da degli ormoni: l'abbassamento della glicemia avviene attraverso l'ormone tipico ipoglicemizzante, l'**insulina**, l'aumento del contenuto glicemico, invece, avviene attraverso il **glucagone**. Altri ormoni che possono innalzare la glicemia sono adrenalina e glucocorticoidi che riescono ad innalzare in maniera repentina il glucosio (soprattutto l'adrenalina).

MECCANISMI DI CONTROLLO DEL SISTEMA GLUCIDICO ED EMATICO

L'innalzamento di glucosio nel sangue può avvenire tramite diversi tipi di approcci:

- posso innalzare direttamente il livello di glucosio facendo sì che gli ormoni agiscano direttamente sul sistema metabolico agendo dunque sul sistema epatico (della gluconeogenesi o della glicogenolisi)

- eseguendo sul tessuto adiposo una lipogenesi, il taglio delle componenti lipidiche fornisce acidi grassi che prendono la via della formazione del glucosio in maniera indiretta.

La parte più delicata della regolazione della glicemia è la parte post prandiale, cioè nel momento in cui l'organismo dopo qualsiasi forma di pasto avrà necessariamente introdotto una componente di zuccheri, in quanto porterà la glicemia al di sopra della soglia dei 100 mg/dl e quindi l'organismo tramite uno stimolo al pancreas provocherà la produzione di insulina per abbassare il livello della glicemia.

La curva da carico è il metodo utilizzato dall'organismo per abbassare e modulare il livello della glicemia, molto importante perché grazie a questo sistema gli zuccheri che circolano all'interno del sangue hanno la possibilità di essere mobilizzati dentro la cellula o accantonati nel fegato sotto forma di glicogeno.

Il fenomeno contrario si verifica in condizioni di digiuno, non bisogna mai saltare il pasto in quanto questo comporta uno stress enorme per il pancreas, creando così degli spike di insulina e a lungo termine questo induce problemi di metabolismo. Durante un pasto e l'altro la quantità di glucosio può diminuire, anche scendendo al di sotto dei valori soglia, in questo caso interverranno ormoni opposti ovvero quelli che agiscono sul GH e sul glucagone innalzando la quantità di glucosio liberandolo dal glicogeno stesso.

GHIANDOLE

Sono molte le ghiandole endocrine che regolano l'omeostasi del glucosio: il pancreas è la più importante perché produce insulina per aumentare, il glucagone per diminuire ma anche il **surrene** ha una funzione analoga ed oltre a questi è presente la **tiroide** che pur non avendo un ruolo diretto nei confronti del sistema glucidico può aumentare attraverso l'ormone **tiroxina** (T3, T4) il metabolismo basale, aumentando così il consumo di glucosio.

FENOMENI DI IPOGLICEMIA E IPERGLICEMIA

Questi fenomeni possono essere distinti in **transitori** o **persistenti**. Quelli transitori sono dettati da ipoglicemia e iperglicemia dovuti a forme meno gravi di problemi metabolici o legati ad un problema organico (epatopatie, infarto); i problemi persistenti sono invece patologie che influenzano l'omeostasi in maniera irreversibile e bisogna ricorrere all'uso di farmaci o terapie particolari per modulare i livelli di glucosio.

Nel caso di iperglicemia persistente si ha un aumento della glicemia costante nel tempo e quindi dobbiamo somministrare farmaci ipoglicemizzanti, l'ipoglicemia persistente, invece, può essere data invece da un insulinoma cioè da un tumore che colpisce la componente endocrina del pancreas inducendo una produzione eccessiva di insulina che tiene troppo basso il livello di glicemia.

È importante capire il meccanismo attraverso il quale questo funziona perché questo ci permette di capire se il danno che osserviamo da un punto di vista metabolico è extracellulare, intracellulare o genetico.

TRASPORTATORI GLUT

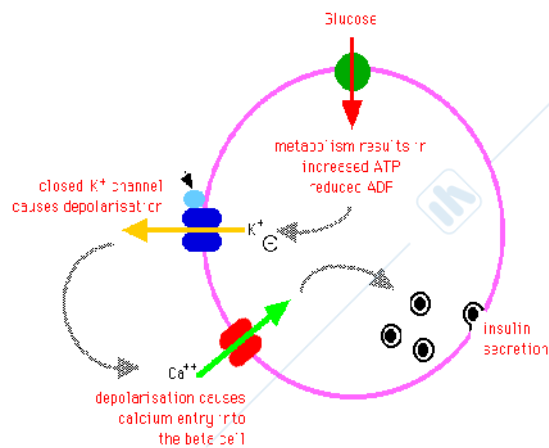
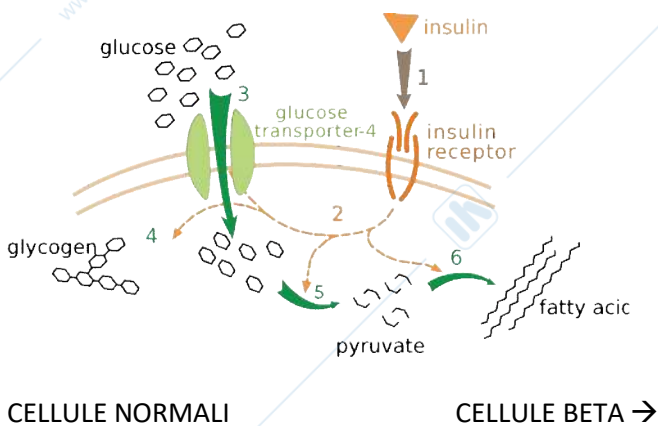
Il glucosio può entrare facilmente all'interno delle cellule beta in quanto queste sono dotate di proteine specifiche che ne permettono l'ingresso mediante diffusione facilitata.

Queste proteine sono i **trasportatori GLUT**, di cui ne esistono diversi tipi: 1, 2, 3, 4, 5.

Tra questi trasportatori il GLUT 2 è quello che capta il glucosio extracellulare, lo internalizza ed aumenta la sua attività di sintesi di ATP. L'aumentata produzione di ATP mette la cellula in condizione di favorevole attività, bloccando così il canale di uscita del potassio e comportando la depolarizzazione di membrana. Creando questo tipo di depolarizzazione, il calcio extracellulare entra nella cellula. Il suo ingresso nelle cellule beta nelle isole di Langerhans permette alla cellula di secernere l'insulina immagazzinata, permettendo l'ingresso del glucosio in tutte le altre cellule.

Ogni volta che questo meccanismo viene meno noi non abbiamo un grande quantità di insulina secreta e quindi il livello di glicemia sarà molto alto, questa è la più comune forma di **diabete**. Il diabete mellito viene identificato quando la quantità di glucosio che circola nel sangue è superiore al valore di 160/180 mg/dl costantemente nel tempo, più sarà costante la presenza elevata di glucosio nel sangue più questa forma di diabete viene conclamata e

definita grave. L'effetto è direttamente proporzionale alla quantità di glicemia che noi possiamo riconoscere, se questa supera la soglia dei 230 mg/dl è definita livello critico se oltre il livello critico si supera abbondantemente arrivando fino a 430 mg/dl la quantità è talmente elevata che l'organismo va in tilt e si ha il coma diabetico.



DIABETE MELLITO

Il diabete mellito è molto diffuso nei paesi industrializzati con una frequenza molto elevata, solamente in Italia si ha il 4% della popolazione che soffre di diabete, con una distinzione tra tipo 1 e tipo 2.

Nel **diabete mellito di tipo 2** si ha quando l'insulina è presente ma non in quantità sufficienti (90% della popolazione), mentre nel **diabete mellito di tipo 1** (l'8% della popolazione) definito anche **insulino-dipendente**, non avviene la produzione di insulina che necessita di essere introdotta dall'esterno.

Quando si effettua una classificazione si tengono presenti di queste due forme perché sono le forme che hanno la maggior frequenza.

Il diabete può essere diagnosticato in maniera corretta ed inequivocabile da due fenomeni molto importanti:

- ridotta tolleranza al glucosio (quanto più glucosio viene dato a quel soggetto più la risposta glicemica è alta perché non c'è un'adeguata modulazione dell'insulina);
- alterata glicemia a digiuno (cioè la capacità dell'organismo a digiuno di liberare attraverso il glucagone molto più glucosio creando iperglicemia).

Parlando di diabete mellito di tipo 1, ovvero quello dell'insulina dipendenza, il pancreas non è in grado di produrre insulina, soprattutto perché le cellule beta delle isole di Langerhans non sono in grado di produrre adeguate quantità di insulina. Nel caso di diabete mellito 1 c'è una predisposizione genetica, poiché questi soggetti presentano un'alterazione di alcuni geni su cui non sono sufficienti le modulazioni di tipo predispositivo ma occorrono anche delle modificazioni di carattere ambientale.

Questo comporta il riconoscere all'interno del soggetto una cascata temporale di eventi: c'è un soggetto che viene identificato come a rischio cioè che geneticamente può essere predisposto ad avere delle alterazioni, esiste inoltre l'evento precipitante ovvero il sistema che induce il processo immunologico dei linfociti ad attaccare l'antigene delle cellule beta da questo punto in poi tutte le cellule beta subiscono il danno auto-immunitario per cui si ha il declino fino ad avere dalla distruzione della cellula allora forma di pre-diabete che poi sfocia nella forma conclamata di diabete insulina dipendente.

Il diabete di tipo 2 che si acquisisce con l'età e mantiene una porzione di attività di secrezione di insulina è totalmente diverso dall'approccio auto-immunitario del tipo 1. In questo caso il difetto è prettamente metabolico, quindi il soggetto presenta una iperalimentazione (obesità) e un accumulo eccessivo di lipidi che influisce di conseguenza anche sul metabolismo glucidico tenendo più alto il livello di glicemia. Questo comporta l'aumento costante di insulina fino ad arrivare all'insulino-resistenza: se prima sarebbero stati necessari 10 microgrammi di insulina, rimanendo l'insulto protratto nel tempo vi saranno bisogno di 20 microgrammi. Quindi l'insulino resistenza è una maggiore quantità di insulina per far fronte allo stesso stimolo. Il diabete di tipo 2 se protratto nel tempo

arrecando al pancreas un danno che non gli permetterà di produrre quantità sufficienti di insulina, quindi l'organismo dovrà far fronte a questa mancanza.

INSULINA

Questo è un ormone peptidico prodotto dalle cellule beta in occasione di livelli glicemici molto più alti rispetto alla normalità. Ha la funzionalità di abbassare il livello di glucosio nel sangue per questo viene definito come ipoglicemizzante. L'insulina è una molecola proteica originariamente composta da 110 amminoacidi, poi processata nel reticolo endoplasmatico divenendo una pro insulina di 86 amminoacidi e da quest'ultima si tagliano due pezzi fondamentali, uno è il peptide C, l'altro è l'insulina vera e propria.

L'insulina è quella che verrà secreta attraverso il sistema golgiano per andare verso l'esterno, il peptide C è secreto in quantità esattamente identiche all'insulina, per questo per vedere se un soggetto è insulina dipendente si effettua un dosaggio del peptide C poi quest'ultimo non è degradato con la stessa facilità dell'insulina ed è inoltre prodotto in quantità analoghe all'insulina stessa. Il dosaggio del peptide C avviene tramite anticorpo monoclonale, può essere sempre dosato perché inalterabile, non ha emivita e mi dice quanta insulina viene prodotta a livello attivo. Inoltre se non ho livelli liberi di peptide C questo mi fa capire che rimane sotto forma di pro insulina e che quindi il pancreas non è in grado di attivarla. Il sistema pro insulina subisce un taglio proteolitico da parte dei lisosomi, che staccano il peptide C liberando insulina biologicamente attiva questa viene portata all'esterno sotto forma di granuli e a seconda della necessità questi granuli secerneranno l'insulina.

SINDROME METABOLICA

La **sindrome metabolica** è una condizione molto frequente nell'organismo in cui un individuo presenta un complesso sistema di metabolismi che sono tutti alterati, quindi non avrà alterato solo quello glucidico, bensì anche quello lipidico e quello delle altre componenti di tipo proteico.

Tutti questi metabolismi messi insieme creano una sindrome metabolica che coinvolge più metabolismi, questo comporta in un soggetto che ha una vita sedentaria, che introduce un'alimentazione scorretta ed è soggetto all'obesità, un aumento di insulina nel sangue. Questa insulina incomincia ad essere resistente al sistema del glucosio e così facendo il glucosio resterà alto e per poterlo abbassare avremo bisogno di molta più insulina quindi il pancreas produrrà maggiore quantità di insulina andando incontro ad un fenomeno di stress metabolico che comporta la perdita della sua funzionalità e la comparsa del diabete mellito di tipo 2.

LEZIONE 14 MATTINA (Agata)

Ruolo della biochimica clinica nel Diabete mellito

Quando si parla del ruolo della biochimica clinica del diabete mellito si parla delle opportunità che abbiamo per seguire gli stadi che modificano l'omeostasi del glucosio. A seconda del target che si vuole raggiungere si hanno degli approcci diversi, quindi se si vuole fare una diagnosi o se si vuole controllare il compenso o lo scompenso metabolico. Si hanno dei marcatori specifici che permettono di fare della diagnostica, si può distinguere quindi il diabete metabolico da quello ormone dipendente, e per questo si possono fare o una glicemia a digiuno o una glicemia random, che servono a comprendere come l'organismo risponde nell'arco delle 24 ore a stimoli glicemici oscillanti, è inoltre possibile fare una Glicemia dopo test di tolleranza al glucosio (OGTT) che ci indica se l'insulina è secreta in maniera opportuna per mantenere l'omeostasi in maniera controllata, l'ultimo è quello degli auto-anticorpi, in questo caso però i pazienti hanno una condizione di malattia autoimmune tale che l'organismo distrugge le proprie cellule del pancreas che secernono insulina. Quando invece bisogna fare la sorveglianza del sistema metabolico in questo caso si effettuano una serie di analisi che ci permettono di osservare nel tempo il livello omeostatico del paziente, sono:

- Glicemia: che può essere a digiuno o nell'arco delle 24 ore (random)
- Le proteine glicate: che ci permettono di monitorare il sistema nell'arco dei 120 giorni, mantenendo un livello elevato di emoglobina glicosilata nell'arco di 120 giorni ci dice quanto quel soggetto ha una tendenza a mantenere troppo elevato il sistema glicemico, e quindi favorisce la glicosilazione di alcune molecole proteiche. Si è scelta l'emoglobina per il range di 4 mesi.
- Corpi chetonici

- **Profilo lipidico:** se alterato la beta ossidazione degli acidi grassi comporta un recupero eccessivo dei corpi chetoni, questi possono essere seguiti sia nella componente plasmatica che urinaria.

Le complicanze di questa patologia sono:

- **Microangiopatia:** microalbuminuria, il sistema dei vasi sanguigni tende ad avere un rallentamento nella funzione della filtrazione del plasma, generando microalbuminuria.
- **Ateroclerosi :** tutto il sistema di accumulo di lipidi sotto l'endotelio
- **Chetoacidosi:** ci permette di capire se il metabolismo volge verso l'araneobiosi e questo cambia l'emo-gas analisi perché varia il pH del sangue.

La diagnosi può essere effettuata con la glicemia a digiuno in cui non si assumono glucidi o attraverso la glicemia a random in cui bisogna tener conto di aver assunto degli alimenti che potrebbe aver alzato la soglia, ecco perché a digiuno non si devono superare i 125 mg/dl mentre in quella random non si devono superare i 200 mg/dl. Un valore di iperglicemia che non soddisfa i criteri diagnostici, per il diabete deve essere rivalutato con un carico orale di glucosio (OGTT, *Oral Glucose Tolerance Test*), con la somministrazione di 75 g di glucosio disciolto in 250-300 mL di acqua. Questo serve per la **Curva da carico glicemico**.

L'innalzamento glicemico è diverso tra il soggetto normale e quello diabetico, perché mentre nel soggetto normale la risposta insulinica è rapida e duratura nel tempo e riporta i livelli di glicemia nei parametri normali. Il soggetto diabetico invece ha un innalzamento dell'insulina ma sicuramente manterrà comunque livelli di glicemia molto alti, quindi questi due parametri ci permettono di costruire delle curve. La curva da carico ci permette di osservare nella popolazione normale che anche dopo un trattamento da curva da carico, il sistema della glicemia nell'arco della somministrazione del glucosio rimane al di sotto dei 140 mg/dl senza mai superarlo, è la risposta massima ad una concentrazione di glucosio. Le persone che hanno una ridotta tolleranza di glucosio sono i soggetti che hanno una sensibilità maggiore ed una alterata risposta del pancreas, in questi soggetti l'insulina viene secreta ma non è sufficiente a riportare il glucosio ad un livello normale.

Questa ridotta tolleranza è l'anticamera del diabete e prende il nome di **insulinoresistenza**. Un paziente che ha un diabete conclamata avrà una glicemia che supererà i 200 mg/dl. Quando si osserva la curva da carico si osserva la risposta nel tempo, all'inizio avremo dei valori al di sotto dei 100 mg/dl, subito dopo l'assunzione di avrà subito un innalzamento che non deve superare i 140 mg/dl, tra la prima ora e la seconda avviene lo stimolo pancreatico quindi in un individuo normale, si ha un rilascio di insulina che ha un effetto ipoglicemizzante e nella seconda ora si deve ritornare alla condizione fisiologica di partenza o comunque in condizioni molto simili, nel momento in cui l'insulina fa effetto se la dose di questa non viene modulata per il soggetto, l'insulina continua ad avere effetto ecco perché nella terza ora si avrà una discesa glicemica maggiore, questo è il rischio opposto ovvero un effetto **ipoglicemizzante**, in cui l'insulina svolge ancora il suo lavoro e il livello glicemico si abbassa molto, dopo di che si innesca il meccanismo di recupero del sistema glicemico, quindi il glucosio viene captato e inserito nella cellula grazie ai vari trasportatori e verso la 5 ora la glicemia ritorna ai livelli normali. Se invece osserviamo la curva di un individuo che possiede una resistenza al trattamento glicemico o di un individuo diabetico, vedremo che la curva ha un aspetto completamente diverso. Innanzitutto si parte ad un livello più alto, a tempo 0 quindi avremo una soglia di oltre 140 mg/dl (soggetto a digiuno), dopo lo spike del trattamento il livello di glucosio nel sangue aumenta e nell'arco della prima ora i livelli superano i 200 mg/dl, dalla seconda ora in avanti pur secernendo una normale quantità di insulina questa non è in grado di abbassare il livello glicemico, questo comporta uno stato di glicemia esagerato, portando a complicanze croniche. Questi soggetti devono sottoporsi ad un trattamento farmaceutico che abbassa sia il livello insulinico che quello glicemico

TABELLA 17-4 Individui ad alto rischio per i quali l'American Diabetes Association raccomanda lo screening per il diabete mellito

Individui delle seguenti razze: Africani, Asiatici, Ispanici, Nativi Americani, Isolani del Pacifico
Madri con neonati >4 Kg o con una storia di diabete mellito gestazionale
Individui con ipertensione $\geq 140/90$, HDL colesterolo ≤ 35 mg/dL, o trigliceridi ≥ 250 mg/dL
Individui con una storia di alterata glicemia a digiuno o alterata tolleranza al glucosio
Individui obesi che pesino $\geq 120\%$ del peso ideale
Individui con parenti di primo grado con diabete mellito

HDL, high-density lipoprotein - lipoproteine ad alta densità.

Quelli nella tabella sono le condizioni di elevato rischio per il diabete.

DIABETE MELLITO GESTAZIONALE

Questo subentra nell'arco dei 9 mesi, si riconoscono alcune particolarità: donne che hanno un' aumentata pressione intrauterina vanno incontro ad un'alterazione del sistema glucidico quindi l'omeostasi per loro è alterata, entrano in un quadro clinico che si chiama **gestosi**.

La gestosi comporta una perdita della funzionalità dei vasi creando delle condizioni di particolari rischi come aborti spontanei. Occorre sempre controllare il progresso delle tipologie gravidiche della madre, il peso e anche la glicemia attraverso la curva da carico (in questo caso vanno assunti 50 mg/dl e non 75 mg/dl).

Quando si fa una misurazione della glicemia bisogna tener conto di alcuni parametri:

Campione biologico: **plasma**, siero, sangue intero o urina. A parità di volume, gli eritrociti contengono meno glucosio rispetto al siero. Quindi, nel **sangue intero la glicemia** è più bassa rispetto al siero di circa il 10%, questo abbassa il livello quindi vi è il rischio di un falso negativo.

Inoltre, nel **sangue venoso la glicemia** è più bassa del 5-10% rispetto al sangue arterioso. Per misurare la glicemia occorre **separare entro 60 minuti il plasma o il siero**, perché gli **eritrociti consumano glucosio**, quindi diminuiscono la glicemia (circa 6 mg/dL/h). Più tempo passa tra il prelievo e l'analisi più il livello del glucosio si abbassa.

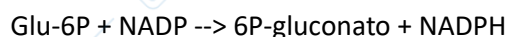
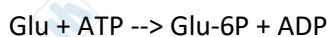
L'unico anticoagulante che non va mai usato è il fluoruro di sodio perché è un glicostatico quindi crea il problema della inibizione della glicolisi quindi tutto ciò che avviene sia in extra che intra-cellulare tende ad essere alterato. (cercare se è vero perché nelle slide c'è scritto il contrario: "Ideale: utilizzare **Fluoruro di Sodio** come **anticoagulante** e **glicostatico** (poiché inibisce la glicolisi, e limita il consumo di glucosio da parte degli eritrociti)").

Quanti e quali metodi ci sono per dosare il glucosio all'interno di un campione?

Bisogna prima di tutto conoscere le caratteristiche del glucosio: presenta gruppo glicosidico aldeidico ($R-C=O$): questo è facilmente ossidabile a gruppo carbossilico ($R-COOH$). Il gruppo carbossilico agisce come agente riducente.

Possono essere usati 3 metodi che si possono utilizzare per analisi:

- **Esochinasi** (metodo di riferimento)



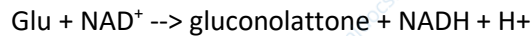
Utilizza la classica via glicolitica.

Primo step: Si fa interagire il glucosio con una molecola di ATP per la fosforilazione e ottenere il glucosio 6 fosfato.

Secondo step: il glucosio 6 fosfato in presenza di NADP, quindi di un componente enzimatico di grado di accettare ioni idrogeno, non fa altro che ossidare il gruppo aldeidico formando così il 6-fosfo-gluconato.

Quello che si ottiene è che si ottiene una variazione spettrofotometrica tra NADP e NADPH. Il NADPH può essere rivelato con un'assorbanza pari a 400nm. Quindi attraverso l'aumento del NADPH in correlazione con la legge di Lambert Beer si ricava la quantità sumerica, in base alla curva standard, del glucosio originale.

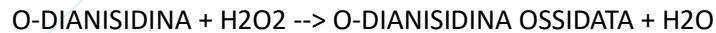
- **Glucosio deidrogenasi**



Se si pone il glucosio insieme al NAD⁺ si avrà una reazione diretta, in quanto il prodotto sarà rilevabile. Il NAD⁺ assume ioni idrogeno, il glucosio si trasforma in gluconolattone (non dosabile) ma si ottengono anche il NADH⁺ che è misurabile con assorbanza a 450 nm.

- **Glucosio ossidasi**

Metodo più utilizzato in lab.



Questo è un metodo accoppiato con una sostanza colorimetrica che si chiama diaminobenzidina. Il glucosio si trova in una soluzione acquosa, si aggiunge l'enzima glucosio ossidasi e così si ottiene l'acido gluconico più il perossido di idrogeno, quest'ultimo essendo fortemente reattivo va ad ossidare il cromogeno inattivo (diaminobenzidina) formando o-dianisidina colorata che a 450 nm può essere seguita e quindi è possibile risalire dalla concentrazione del cromogeno alla concentrazione del glucosio.

Quando si fanno delle valutazioni di follow-up quello che interessa è seguire con il passare del tempo il paziente se la terapia è corretta nel mantenere il glucosio all'interno dei valori normali, quindi bisogna individuare tutti quei parametri che permettono di compensare quello che l'organismo non riesce più a svolgere e ridurre il rischio di insorgenza/progressione delle complicanze diabetiche. questo avviene attraverso delle analisi:

Glicemia (anche automisurazione)
Emoglobina glicata (HbA1c)
Glicosuria
Chetonuria
Albuminuria/creatininuria
Assetto lipidico (Col-tot, HDL, TAG, LDL, apoproteine)
Creatinina sierica e stima GFR
Microalbuminuria
Markers infiammazione (hsPCR)

I risultati del monitoraggio permettono di valutare se la terapia è efficace o se è necessario apportare eventuali modifiche alla dieta, all'attività fisica e alla terapia farmacologia in modo tale da ottenere il miglior controllo glicemico possibile.

Quali sono i sistemi che dobbiamo ottenere con queste analisi?

- Controllo della quantità glicemica inferiore ai 120 mg/dl se a digiuno
- L'emoglobina glicosilata per poter avere un buon effetto deve essere sempre inferiore al 7%, se si supera questo valore allora si avrà un problema cronico.
- Glicemia post-prandiale deve essere inferiore ai 180 mg/dl

È importante avere un range, perché andare al di sotto di un determinato livello allora si può andare in contro ad un problema ipoglicemico.

Il monitoraggio del DM avviene attraverso le proteine glicosilate, in un ambiente ricco di glucosio, questo si lega stabilmente alle proteine, determinando la loro glicazione; Per definizione l'entità della glicazione è proporzionale all'integrale della concentrazione di glucosio per il tempo di contatto (emivita della proteina);

Proteine che possono essere monitorate:

- Emoglobina glicosilata
- Albumina glicosilata
- Fibrinogeno glicosilato
- Fruttosammine

È stata scelta quella dell'emoglobina perché ha una limitazione temporale, essa ha una durata di 120 giorni quindi trovare l'emoglobina glicosilata significa che nei 120 giorni precedenti il livello glicemico è sempre stato molto alto. La misura dell'Hb glicata è maggiormente standardizzata dal punto di vista analitico e validata clinicamente.

Si usa in sostituzione la **fruttosammina** quando: È necessaria un'informazione relativa ad un periodo più breve (es. per valutare gli effetti della variazione di una terapia); **Motivazioni** biologiche (es. anemia emolitica) o analitiche (presenza di varianti emoglobiniche) che **rendono inaffidabile la misura dell'Hb glicosilata**. Però la fruttosammina non dura 120 giorni quindi l'analisi è limitata.

EMOGLOBINA GLICOSILATA

L'emoglobina non viene glicosilata per un effetto enzimatico, ma per una reazione spontanea. Quindi con l'aumentare della concentrazione del glucosio nel sangue, aumenta la possibilità che questa si leghi all'emoglobina. Questo legame avviene attraverso un sistema chiamato **reazione di maliard** che permette al glucosio di attaccarsi all'estremità ammino-terminale dell'emoglobina A, in particolare al gruppo della valina. Come avviene il sistema di legame? Il glucosio ha una reazione veloce di attacco e stacco, è una reazione reversibile, quindi se il soggetto ha sole piccole quantità di glucosio l'emoglobina è in grado di tornare alla normalità, se invece l'iperglicemia persiste allora questa reazione diventa irreversibile, infatti dopo la prima reazione si ha una seconda reazione altrettanto veloce di una componente glucidica che trasforma il gruppo aldeidico in un gruppo chetonico (chetoamina stabile) che si lega stabilmente al gruppo ammino-terminale della valina. Quindi la molecola di emoglobina resterà glicosilata fino alla morte del globulo rosso.

La reazione reversibile va a creare la BASE DI SHIFT ed è alla base di tutte le reazioni per vedere le componenti glucidiche. Il **PRODOTTO DI AMADORI** invece è quello che rende la componente glucidica stabile nell'emoglobina.

CORRELAZIONI TRA GLICEMIA MEDIA E VALORI DI GLICOHb

Generalmente, ogni aumento di 1% dell'Hb-glicata corrisponde ad un aumento della **glicemia pari a 35 mg/dl di glucosio plasmatico medio**. Il dosaggio della glicemia riflette il valore del **glucosio nel sangue in quel determinato momento; l'HbA1c correla con la media delle glicemie nei 2-3 mesi precedenti l'esame**. Se la glicemia è stata elevata per la maggior parte di questo tempo la HbA1c sarà alta;

Se la glicemia è stata bassa, tranne in poche occasioni, la HbA1c sarà bassa;

Non è in grado di individuare i picchi e cioè la variabilità glicemica

Average Daily Blood Sugar	A1C Level
135	6%
170	7%
205	8%
240	9%
275	10%
310	11%
345	12%

Table 1. Chart showing how average daily average plasma blood glucose levels compare to 2-3 month A1C test results.

LEZIONE 14 mattina 2 parte

Il test di monitoraggio di HbA1c permette di tenere sotto controllo un soggetto diabetico durante la terapia, la valutazione retrospettiva del metabolismo glucidico e del grado di controllo glicemico negli ultimi due mesi e, inoltre, permette di predire lo sviluppo di complicanze in quanto stabile (non risente di improvvise variazioni di glicemia).

Ridurre i livelli di HbA1c determina una riduzione del rischio di complicanze diabetiche (retinopatia, microalbuminuria, neuropatia) del 35% per ogni punto ridotto.

Questo test può però subire delle interferenze: potranno essere presenti falsi positivi, in caso di HbA1c alto dovuto ad un ridotto turnover dei globuli rossi (emoglobinopatie, anemie Fe/folato-carenziali), o falsi negativi in caso di HbA1c basso dovuto a percentuale maggiore di globuli rossi giovani (emolisi e trattamenti da anemia)

GLICOSURIA

Generalmente quando la **glicemia supera i 180 mg/dl** (soglia renale di riassorbimento tubulare), il rene non riesce a riassorbire tutto il glucosio presente nel sangue e il glucosio non riassorbito passa nelle urine e compare la glicosuria.

Se la condizione di non assorbimento si protrae nel tempo e non viene ristabilita, il rene può incorrere in alterazioni croniche della funzionalità renale in cui si avranno perdite di ulteriori molecole come l'albumina.

ALBUMINURIA

Attraverso i 2 reni circolano circa 0.65 L/min di plasma e solo lo 0.004% (1.3 g/die) dell'albumina circolante riesce ad oltrepassare il filtro glomerulare. Dell'albumina che ha oltrepassato il glomerulo, il 99% viene catabolizzato dalle cellule del tubulo renale, mentre l'1% viene eliminato con le urine.

L'efficienza del filtro glomerulare e l'elevata concentrazione plasmatica dell'albumina (40 g/L) rendono la misurazione dell'albuminuria un sensibile indice di danno glomerulare.

L'albuminuria si misura in

- $\mu\text{g}/\text{min}$ (su raccolta temporizzata)
- in $\text{mg}/24$ ore.
- come rapporto albumina(μg) /creatinina(mg)

Si parla di albuminuria **NORMALE** quando i valori sono: $< 20 \mu\text{g}/\text{min}$ o $< 30 \text{mg}/24\text{h}$ o $\text{alb}/\text{creat} < 30 \mu\text{g}/\text{mg}$

Si parla di **MICROALBUMINURIA** quando i valori sono: 20 e $200 \mu\text{g}/\text{min}$ o tra $30-300 \text{mg}/24\text{h}$ o alb/crea $30-300 \mu\text{g}/\text{mg}$

Si parla di **MACROALBUMINURIA** quando i valori sono: $> 200 \mu\text{g}/\text{min}$ o $> 300 \text{mg}/24\text{h}$ o $\text{alb}/\text{crea} > 300 \mu\text{g}/\text{mg}$

Il riscontro di una microalbuminuria rappresenta il principale dato di laboratorio della nefropatia diabetica iniziale, perché è segno di una lesione renale precoce. È inoltre un forte predittore di complicanze cardiovascolari.

La presenza di valori patologici deve però essere confermata in almeno 3 raccolte successive per garantire un'assenza di infezione.

CORPI CHETONICI

Quando il glucosio non riesce ad entrare nelle cellule per fini energetici (deficit insulinico, insulino-resistenza, ipoglicemia, digiuno) gli ormoni iperglicemizzanti stimolano la lipolisi e il rilascio di FFA che a sua volta stimola la β -ossidazione epatica. Aumentando la concentrazione di acetyl-CoA si attiva via biosintetica dei corpi chetonici nel fegato.

I corpi chetonici sono utilizzati come fonte energetica solo dai tessuti extraepatici (il fegato non possiede la acetoacetato:succinil-CoA transferasi)

I corpi chetonici sono l'acetoacetato, il β -idrossibutirrato e l'acetone. Questi composti circolanti nel sangue sono tossici per l'organismo (chetoacidosi) e vengono eliminati attraverso l'emuntorio renale.

Dosare la chetonuria (i corpi chetonici nelle urine) e la chetonemia (corpi chetonici nel sangue) è utile per confermare la diagnosi di chetoacidosi diabetica e per la sorveglianza del pz diabetico.

Chetonemia → **Dosaggio sierico dei corpi chetonici** dosaggio dell'idrossibutirrato mediante metodo enzimatico

In condizioni normali $< 0,5 \text{mM}$

Iperchetonemia $> 1 \text{mM}$

Chetoacidosi $> 3 \text{mM}$

Chetonuria → **Dosaggio urinario dei corpi chetonici**: dosaggio dell'acido aceto-acetico nelle urine mediante sticks reattivi, che si colorano in viola con un'intensità che varia a seconda della concentrazione dei corpi chetonici.

MARKERS DI AUTOIMMUNITA' DI UTILITA' CLINICA

Il diabete mellito di tipo 1 è associato ad una risposta immunitaria (malattia autoimmune): avviene una produzione di anticorpi nei confronti delle cellule β pancreatiche (cellule che producono l'insulina).

La distruzione di queste cellule è mediata da linfociti T e non essendo presenti delle cellule staminali che producano nuove cellule β pancreatiche, una volta distrutte si va incontro ad una perdita funzionale del tessuto.

Queste forme di DM-1 sono classificate come DM di tipo 1A o IMD (IMMUNO-MEDIATO) e nell'85-90% dei soggetti che lo presentano alla prima osservazione è possibile dimostrare la presenza di markers di auto-immunità.

Auto-anticorpo	Frequenza (DM-tipo 1)
Anti-citoplasma delle cellule insulari (ICA)	70-80%
Anti-glutammato decarbossilasi (GADA)	70-80%
Anti-antigeni associati all'insulinoma	60%
Anti-insulina (IAA)	Adulti < 10% 50% Bambini

Le anti-citoplasma delle cellule insulari sono gli anticorpi diretti contro le cellule che producono insulina e sono l'unico marcatore sierologico disponibile per valutare un danno alle cellule beta.

La scomparsa delle cellule β pancreatiche risulta essere quasi totale (70-90%), mentre le altre cellule costituenti il pancreas non vengono intaccate; il processo infiammatorio termina quando ha completato la distruzione cellulare. La distruzione delle cellule β pancreatiche inizia con un'infiltrazione cronica da parte di linfociti (CD8+, CD4+ attivati, pochi macrofagi, pochi NK)..Questa condizione prende il nome di **insulite infiltrativa**.

Nel restante 10-15% dei casi di DM-1 l'eziologia è invece ignota (e si parla di DM-1B o idiopatico) e non c'è evidenza di attivazione dei meccanismi autoimmunitari.

Anche il 10-15% dei pazienti con DM-2 può mostrare positività per markers di autoimmunità (es.GADA)

INSULINA E PEPTIDE C

Quando l'insulina viene prodotta, viene prodotta sotto forma di **proinsulina**. Questa viene poi trasformata in insulina attraverso tagli proteolitici che rimuovono una sequenza segnale che prende il nome di **peptide C**.

Perciò, il peptide C viene rilasciato in quantità equimolari all'insulina.

Il peptide C riflette in una maniera più soddisfacente il reale stato della secrezione delle cellule β del pancreas: infatti l'insulina, una volta immessa nel circolo portale, viene catturata per più del 50% al primo passaggio, dal fegato e subisce inoltre un significativo "uptake" da parte dei **tessuti bersaglio**.

Il tasso insulinemico non riflette quindi in maniera del tutto accurata la funzione endocrina delle cellule β del pancreas.

Il peptide C viene invece captato solo in minima parte dal fegato (10% circa) ed ha un'emivita doppia, rispetto l'insulina presenta una maggiore stabilità dei livelli sierici.

La maggior parte del peptide C circolante è degradata nel rene ed è parzialmente escreta nelle urine.

Il peptide C è aumentato nelle seguenti condizioni: insulinoma, insufficienza renale, diabete tipo II, ingestione di ipoglicemizzanti orali. Mentre è diminuito nelle seguenti condizioni: ipoglicemia iatrogena, pancreatemia radicale, DM-tipo1

Ricapitolando, per la diagnosi di laboratorio del diabete di tipo 1 si utilizzano:

- ICA – anticorpi contro le cellule insulari
- IAA – contro l'insulina
- IA2-A, GAD: componenti delle cellule pancreatiche
- Dosaggio del peptide C (per verificare la capacità biosintetica residua) + gli accertamenti del DM-2 classici

Mentre, per la diagnosi di laboratorio del diabete di tipo 2 si utilizzano:

- Livelli glicemici a digiuno
- Livelli glicemici dopo curva da carico
- Emoglobina glicata (altre proteine glicate AGE)
- Dosaggio del peptide C (in soggetti in terapia insulinica per valutare la capacità biosintetica pancreatiche)

BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

La biologia molecolare in diagnostica di laboratorio ritrova applicazioni in caso di:

1. INFETTIVOLOGIA

- BATTERIOLOGIA (Mycobacterium Tuberculosis)
- VIROLOGIA (Herpes Simplex, Papilloma virus, HCV, HIV)
- PARASSITOLOGIA (amebiasi, malaria, toxoplasmosi)

2. ONCOLOGIA

- DIAGNOSI PRECOCE (K-RAS, P53, BCL-2)
- TEST PREDITTIVI (carcinoma della mammella ed ovarico)

3. GENETICA

- DISORDINI MONOFATTORIALI (distrofia, fibrosi cistica)
- DISORDINI MULTIFATTORIALI (trombofilia)
- INFERTILITA' MASCHILE (microdelezioni cromosoma Y)

4. NUTRI- E FARMACOGENOMICA

APPLICAZIONI IN INFETTIVOLOGIA

L'utilizzo di tecniche di biologia molecolare in infettivologia ci permettono di effettuare una chiara identificazione della malattia e dei singoli ceppi che la causano: permettono quindi una terapia mirata contro il target e non ad ampio spettro. Non esistono marcatori sierologici di infezione oppure i marcatori che esistono sono poco sensibili (es. anticorpi)

Quindi oltre che dal punto di vista diagnostico, l'utilizzo di queste tecniche è importante per il punto di vista terapeutico. È ben nota l'importanza della risposta acquisita nei confronti del sistema di antibiotico resistenza: ci sono delle componenti batteriche che se non usate in maniera opportuna permettono all'organismo di diventare resistente e non rispondere più nei confronti di quella terapia.

L'utilizzo delle tecnologie molecolari in microbiologia clinica è, però, tutt'oggi limitato essenzialmente alla **diagnosi delle infezioni da virus**. Il fatto che la maggior parte dei batteri patogeni siano facilmente coltivabili in laboratorio e quindi "amplificabili" con le metodiche tradizionali e la necessità di microrganismi vitali su cui saggiare la sensibilità ai chemioterapici antibiotici hanno fatto sì che la biologia molecolare non abbia ancora trovato ampia applicazione nel campo della batteriologia clinica.

In campo batteriologico, l'applicazione della biologia molecolare risulta ancora finalizzata al rilevamento ed identificazione di specie batteriche particolarmente difficili da coltivare (*Chlamydia trachomatis*) o coltivabili in tempi inaccettabilmente lunghi (***Mycobacterium tuberculosis***).

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

Il *Mycobacterium tuberculosis* è l'agente eziologico della tubercolosi (infezione polmonare). Chiamato anche bacillo di Koch appartiene alla famiglia dei gram-variabili.

L'infezione tubercolare inizia quando i micobatteri raggiungono gli alveoli polmonari, dove attaccano e si replicano all'interno dei macrofagi alveolari. I meccanismi di patogenicità e i fattori di virulenza sono legati alle strutture della parete batterica (**muramyl-dipeptide**) che sono potenti regolatori della risposta immunitaria cellulo-mediata con attivazione di macrofagi.

I tradizionali metodi diagnostici (ricerca della presenza di germi acido-alcool-resistenti mediante tecnica di **colorazione di Ziehl-Nielsen**) e colturali hanno tempi di risposta molto lunghi (almeno 3-4 settimane) e possono creare falsi negativi. Con la PCR, invece, si hanno **risposte molto rapide** (1-2 giorni) con elevata **sensibilità** (possibilità di porre in evidenza il micobatterio anche quando la sua concentrazione è minima).

I campioni clinici utilizzabili sono: colture cellulari, sedimento urinario, reperti respiratori, sangue periferico, biopsie fresche o congelate, aspirati gastrici, materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina.

La regione che viene amplificata al fine della diagnostica è una regione di DNA presente all'interno della **sequenza di inserzione IS6110**. IS6110 ha una lunghezza di 1361 bp, mentre il frammento amplificato IS986 è di 122 bp. Il DNA utilizzato viene estratto da campioni respiratori (citologici, istologici freschi, congelati, o inclusi in paraffina) o colture batteriche.

HERPESVIRIDAE

L'herpesviridae è una famiglia di virus a DNA con la caratteristica di non abbandonare più l'ospite dopo la prima infezione e di annidarsi in un tipo di cellula dell'organismo, causando una cosiddetta infezione latente. Questa si verifica in un tempo variabile a seconda del tipo di virus e della sensibilità dell'ospite. Da tale stato di latenza il virus può riattivarsi, anche dopo molti anni, dando luogo a una recidiva della malattia. Gli stimoli che inducono il "risveglio" dell'attività virale possono essere il caldo, il freddo, i traumi, la febbre, gli stress e soprattutto le variazioni dello stato di difesa immunitaria dell'ospite.

Esistono tre sottofamiglie in base al loro sito di latenza specifico:

- ▶ **Alpha-herpesvirinae** (Virus dell'Herpes Simplex 1 e 2, Virus della Varicella Zooster); sede di latenza: terminazioni nervose del SNC
- ▶ **Beta-herpesvirinae** (Cytomegalovirus, HHV-6, HHV-7); sede di latenza: endotelio e epitelio di ghiandole salivari e tubuli renali
- ▶ **Gamma-herpesvirinae** (virus di Epstein-Barr, HHV-8); sede di latenza: cellule linfoidi.

La prima sottofamiglia è responsabile dell'herpes labiale (HSV1) e genitale (HSV2), ma anche della più grave Varicella.

La seconda sottofamiglia, il cui più famoso esponente è il Citomegalovirus, provoca infezioni spesso asintomatiche, ma molto pericolose in caso di gravidanza, AIDS, trapianto e negli immunocompromessi.

La terza sottofamiglia comprende il virus di Epstein-Barr che provoca la mononucleosi infettiva, ma viene spesso associato ad alcuni tumori.

Sebbene l'infezione da parte di questi virus sia asintomatica nella maggioranza dei casi, quando è presente in pazienti con situazioni più critiche, ad esempio negli immunocompromessi, HIV positivi, in donne gravide od in caso

di trapianto d'organo, tessuto o midollo. La precisa diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione risultano cruciali in quanto l'esito può essere spesso infausto. In particolare, nel caso dei trapianti, la trasmissione di questi virus è un evento comune, che può compromettere seriamente l'esito del trapianto stesso.

HERPES SIMPLEX: Virus a DNA a simmetria icosaedrica, provvisto di involucro pericapsidico ed in grado di replicarsi nel nucleo delle **cellule epiteliali** da cui si liberano per infettare cellule contigue.

Ne esistono di due tipi:

- **HSV di tipo 1:** herpes labiale, orofaringeo e oculare (trasmesso per via orale e attraverso le secrezioni respiratorie).
- **HSV di tipo 2:** herpes genitale e anale (trasmesso per via sessuale).

La maggior parte delle infezioni decorre in modo **asintomatico** e la gran parte della popolazione è portatrice di uno o entrambi questi virus. L'infezione assume però particolare significato in ospiti **immunocompromessi** (malati di AIDS e trapiantati) o in soggetti esposti a radiazioni, stress, febbre, nei quali il virus, presente in forma latente, può subire delle riattivazioni, causando malattie clinicamente definibili.

La diagnosi delle infezioni da Herpes virus può essere condotta mediante isolamento del virus in coltura o mediante ricerca degli antigeni specifici. Entrambi questi metodi però richiedono parecchie ore e necessitano di un materiale di partenza di quantità e qualità adeguate.

Attraverso l'uso di PCR si ha una maggiore sensibilità (evidenzia la presenza del genoma virale nelle prime fasi dell'infezione), una rapidità di risposta, si utilizzano piccole quantità di materiale e non necessariamente di ottima qualità ed è possibile la netta distinzione tra HSV1 e HSV2

L'amplificazione viene effettuata tramite la PCR nested multiplex.

Amplificazione nested multiplex: La nested PCR è una variante della tecnica di PCR, utilizzata per aumentare la specificità dell'amplificazione, che prevede due distinte e successive reazioni di amplificazione: nella prima amplificazione (prima PCR) si utilizza una coppia di primers più esterni al frammento di DNA da amplificare; nella seconda amplificazione (seconda PCR) si utilizza una coppia di primers che amplificano un frammento interno a quello amplificato nella prima reazione.

Il target dell'amplificazione è presente in condizioni completamente diverse nelle due reazioni di PCR. Infatti, nella prima ci sono poche copie di sequenza bersaglio in un "background" di DNA complesso e abbondante mentre nella seconda PCR il numero di sequenze bersaglio è maggiore e il "background" è significativamente ridotto. Si tratta, quindi, di una modifica della PCR tradizionale destinata a ridurre o a eliminare eventuali prodotti aspecifici non desiderati in seguito all'amplificazione di siti di legame di primer inaspettati (primers che possono legarsi a regioni di DNA non corrette). In questo modo, si viene ad aumentare la resa e la specificità di PCR particolarmente difficili.

L'amplificazione è inoltre multiplex, ossia permette la ricerca nello stesso tubo di reazione sia di HSV 1 che di HSV 2.

Il DNA viene estratto da fluidi biologici, tessuti freschi o congelati, fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Nella prima amplificazione (multiplex) vengono amplificati le regioni codificanti per le glicoproteine D e G (lunghezza dei prodotti 213 bp e 183 bp); nella seconda amplificazione (nested) avviene l'amplificazione dei due virus (HSV1 137 bp e HSV2 100 bp).

BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

LEZIONE 14 pomeriggio

HPV: PAPILOMA VIRUS

Il papilloma virus è un genere di virus a dsDNA appartenente alla famiglia dei Papillomaviridae che risulta essere patogeno solo per l'essere umano. Le infezioni da HPV sono estremamente diffuse nella popolazione e sono trasmesse prevalentemente per via sessuale.

Il papilloma virus è un virus a DNA la cui replicazione avviene preferenzialmente nella cute prendendo sia la parte più interna (derma) ma anche la parte più superficiale (epidermide). Ogni tipo di HPV presenta un tropismo specifico per differenti tipi di epitelio: così mentre alcuni tipi interessano prevalentemente la cute, altri interessano l'epitelio delle vie genitali.

Sono stati identificati oltre 150 genotipi di HPV. Per genotipo non si intende la combinazione di componenti che vanno ad alterare il tipo di espressione ma ciò che è predeterminato: sono realmente oltre 150 tipi diversi di HPV e non facenti parte di sotto gruppi o sottofamiglie.

Il genoma è costituito da circa 8000 paia di basi e comprende zone che codificano per proteine precoci (E, da "early") e zone che codificano per proteine tardive (L, da "late").

La proteina L1 è la proteina più rappresentativa del virus (80% delle proteine virali totali) ed ha funzioni strutturali in quanto codifica per le componenti del capsido (proteina capsidica maggiore)

Le proteine E6 ed E7 invece sono oncoproteine, responsabili cioè della capacità oncogenica di HPV.

A livello genitale, l'HPV è responsabile sia di patologie benigne sessualmente trasmissibili, quali i condilomi ano-genitali, che maligne, quali il carcinoma della cervice uterina ed il carcinoma ano-genitale.

Per questo tipo di scoperte nel 2008 è stato conferito il premio Nobel per la medicina ad alcuni ricercatori: si sono divisi il premio i francesi Luc Montagnier e Françoise Barré-Sinoussi per la scoperta del virus dell'Aids e il tedesco Harald zur Hausen per avere individuato l'associazione tra HPV e tumore del collo dell'utero.

All'interno dei genotipi quelli che più frequentemente avevano una possibile correlazione con l'evoluzione delle neoplasie sono presenti:

- HPV a basso rischio oncogeno (HPV 6, 11, 42-44)
 - HPV ad alto rischio oncogeno (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68)
- Oltre due terzi di tutti i carcinomi cervicali sono associati alla presenza di HPV 16 o 18.

Forma clinica	Genotipo HPV
Verruca comune	1,2,4,41
Verruca del cavo orale	6,16
Verruche ano-genitali	6,11,1,2,40-45,51 (condilomi acuminati)
Papillomi laringei	6,11,30
Congiuntivite papillomatosa	6,11
Neoplasia intraepit.non specificata	33, 35
M. di Bowen	6, 31
Papulosi Bowenoidi	16, 34,39,42
Displasia cervicale ad alto grado	16,18
Displasia cervicale a basso grado	6,11,31,45
Carcinomi cervicali e vulvari	16,18,11,31,33,35

Se il DNA del virus rimane nel nucleo della cellula in forma extracromosomica, questo induce una proliferazione di cellule normali dando origine ai condilomi o alle verruche benigne.

Se il virus si integra nel genoma della cellula ospite, questo provoca una espressione delle proteine oncogene E6 ed E7 dell'HPV che a loro volta interagiscono con le proteine regolatrici cellulari, traducendosi in alterazioni sia della struttura che della crescita delle cellule e, in ultima analisi, in tumore. La presenza di questa caratteristica proprietà oncogenica ha predisposto nella maggior parte delle strutture sanitarie lo sviluppo di un

vaccino che può essere somministrato alle persone che non sono ancora entrate in contatto con il virus.

La diagnosi fino ad ora veniva fatta mediante microscopia (pap-test, esame citologico cervicovaginale): veniva effettuata la colorazione di uno striscio del collo dell'utero che permetteva di evidenziare l'alone perinucleare tipico dell'HPV.

Il pap-test presenta però dei limiti: bassa sensibilità e discreta probabilità di errori dovuti non solo all'esecuzione del prelievo ed alla fissazione del campione, ma anche alla esperienza di chi lo analizza. Sono possibili dei falsi negativi (presenza di tumore nonostante responso del test negativo).

Per questo motivo questo metodo di diagnosi è stato totalmente soppiantato da un altro metodo ovvero la diagnosi mediante PCR. Questo tipo di diagnosi ci permette di effettuare diagnosi estremamente precoci: anche in presenza di un bassissimo numero virale è possibile valutarne la presenza, la quantità (virimia) e la genotipizzazione del virus HPV.

- Estrazione.
- Amplificazione doppia che ci permette di indagare sia sulle componenti capsidiche del virus sia sul genoma.
 - o Amplificazione 1: permette di vedere se il virus è in sede extracromosomica;
 - o Amplificazione 2: permette di vedere se il virus è integrato nel genoma (se la risposta è positiva è necessario fare una successiva digestione enzimatica).
- Digestione enzimatica attraverso enzimi di restrizione.

Poiché la sequenza dell'amplificato nella regione L1 varia in funzione del tipo di HPV in esame, la digestione permette di ottenere profili di restrizione che identificano in modo univoco il tipo di HPV presente.

L'analisi dei virus attraverso PCR permette inoltre di ricercare HPV ad alto e basso rischio oncogeno attraverso la presenza delle proteine oncogene E6 ed E7

L'allestimento di tre amplificazioni simultanee, nelle regioni E6 e E7 del genoma virale che permettono l'identificazione di 10 ceppi di HPV ad alto rischio oncogeno (HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56 e 58) e dei 2 ceppi di HPV universalmente riconosciuti a basso rischio oncogeno (HPV 6 e 11).

Genotipo HPV	Restrizione con enzima A (bp)	Restrizione con enzima B (bp)	Dimensioni indigenti (bp)
HPV 6	30, 40, 67	79	139
HPV 11	33, 6, 103	140	140
HPV 16	30, 43, 70	81, 180	140
HPV 18	30, 35, 77	37, 50, 83	145
HPV 31	30, 4, 5	11, 19, 30, 77	140
HPV 33	30, 19, 70	80, 83	133
HPV 35	30, 40, 70	11, 33, 80	140
HPV 56	13, 33, 40, 51	29, 31, 67	140

Vaccini

L'Italia è il primo Paese europeo ad aver pianificato una strategia vaccinale pubblica contro il Papillomavirus (HPV), agente causale del carcinoma della cervice, rivolta a tutte le ragazze al compimento dei dodici anni.

Il 70-80% dei tumori invasivi della cervice sono causati dall'infezione da HPV-16 o HPV-18, ciò ha indotto l'industria farmaceutica a focalizzare su questi due genotipi i propri sforzi per disegnare un vaccino preventivo.

La relazione di causalità tra infezione da HPV-6 e 11 e genesi dei condilomi genitali, patologia benigna ma estremamente frequente, ha inoltre indotto ad includere questi due genotipi nella formulazione del vaccino generando così un prodotto quadrivalente.

Vaccini profilattici: - Bivalente HPV-16 e 18 - Quadrivalente HPV-16, 18, 6, 11

Sono costituiti da proteine ricombinanti HPV specifiche (L1: proteina maggiore del capsido) che si autoassemblano a formare particelle similvirali (Virus Like Particles – VLP) morfologicamente simili alle particelle virali native, ma non infettive per la mancanza di acido nucleico.

I vaccini vengono somministrati per via intramuscolare in tre dosi successive (0.5 ml ciascuna) al tempo 0, a 1 o 2 mesi e a 6 mesi.

Entrambi i vaccini hanno dimostrato un elevato livello di sicurezza, con un numero di eventi avversi gravi praticamente nullo e una buona tollerabilità con effetti collaterali in genere limitati alla sede di iniezione.

HCV (virus epatite C)

Il virus dell'epatite C (HCV) è un membro della famiglia dei Flaviviridae ed è l'unico membro del genere Hepacivirus. È un virus a RNA a singolo filamento perciò presenta un genoma lineare al cui interno ritroviamo due regioni non codificanti alle estremità 5' e 3' (NTR, non-translated region), regioni del core (C) e dell'envelope (E1, E2) e proteine non strutturali (NS2, NS3, NS4, NS5).

L'HCV è inoltre l'agente eziologico dell'Epatite virale C: *l'epatite C cronica è definita come l'infezione da virus dell'epatite C, individuato in base alla presenza del suo RNA, persistente per più di sei mesi*

Esistono 4 genotipi diversi di questo virus: HCV-1, 2, 3, 4.

La diagnostica di routine dell'infezione da HCV ha un limite fondamentale: quello di essere una diagnostica indiretta per la ricerca di anticorpi, e quindi non permette di distinguere con sicurezza lo stato di infezione cronica da quello di soggetto guarito spontaneamente. La diagnostica molecolare permette sia di rilevare la presenza del virus quando ancora non è evidenziabile la risposta anticorpale (periodo finestra), sia di verificare l'effetto terapeutico della terapia interferonica od antivirale in genere. Diventa importante per l'HCV perché ha una diffusione molto ampia e uno stimolo anticorpale basso: può creare una diffusione a livello epatico dando luogo a sintomatologia solo dopo molto tempo.

Inoltre, in caso di soggetti con ALT (transaminasi) normali ed infezione cronica la ricerca del genoma virale è necessaria per sapere se il virus è inattivo (esame negativo) o se il virus pur replicandosi (esito positivo) non è stato in grado fino a quel momento di danneggiare il fegato in modo significativo.

L'unico sistema di cura per l'HCV è la terapia antivirale con interferone che va a bloccare il sistema di replicazione del virus.

È ormai provata una stretta relazione tra i genotipi HCV 1 e 4 e una bassa risposta alla terapia con Interferone, mentre i genotipi 2 e 3 presentano una risposta decisamente migliore alla terapia. Inoltre, i pazienti con basse viremie iniziali rispondono decisamente meglio alla terapia rispetto a quelli con viremie iniziali più alte.

Di conseguenza, prima della terapia è importante valutare:

- il genotipo virale (1, 2, 3 o 4) (analisi qualitativa)
- la carica virale "basale" (viremia) (analisi quantitativa).

Durante la terapia normalmente il paziente viene monitorizzato mediante la ricerca dell'HCV-RNA, per mettere in evidenza la scomparsa o meno del virus circolante. Dopo il termine della terapia, nel follow-up, si continua a ricercare l'HCV-RNA, per evidenziare le situazioni di ricaduta.

La scomparsa dell'HCV-RNA è ritenuta, assieme alla normalizzazione delle ALT, uno degli obiettivi della terapia. In particolare i pazienti che, pur avendo una normalizzazione delle ALT restano positivi per HCV-RNA, sono anche quelli che più frequentemente hanno poi una ripresa dell'attività virale alla fine del trattamento.

Diagnostica molecolare

Prima dell'introduzione dei metodi di diagnostica molecolare venivano utilizzati unicamente metodi di diagnostica "indiretta" volta ad identificare i soggetti infetti che avevano sviluppato anticorpi anti-HCV. Pertanto molti individui infetti sfuggivano alla diagnosi durante il cosiddetto "periodo finestra" (periodo durante il quale il virus si replica ed è presente nel siero del soggetto infetto, ma non si è ancora sviluppata una reazione immunologica significativa).

Tali individui infetti non venivano identificati come sieropositivi non avendo ancora sviluppato anticorpi (sierconversione) e potevano consentire un'ulteriore trasmissione della infezione.

Grazie alle applicazioni cliniche della PCR è stato quindi possibile ottenere una diagnosi più precoce della infezione, senza attendere la sierconversione.

I primi metodi di indagine diagnostica basati RT-PCR sono stati utilizzati per la diagnosi di infezione da virus della immunodeficienza umana acquisita, HIV.

I test molecolari per la ricerca dell'HCV-RNA utilizzano come "target" di amplificazione la regione 5' NTR, cioè la regione non trascritta presente all'inizio del genoma di HCV. Questa è infatti la regione in assoluto più costante del genoma e quindi meno variabile.

Per la ricerca qualitativa di HCV-RNA circolante si utilizza la RT-PCR.

Per la quantificazione della viremia si utilizzano metodi di PCR quantitativa (real time PCR).

Ricerca qualitativa di HCV-RNA: RT-PCR

Il metodo oggi più diffuso per la ricerca qualitativa di HCV-RNA è la RT-PCR, cioè una reazione di PCR preceduta da una fase di retrotrascrizione.

Il test disponibile in commercio prevede tre fasi:

- La prima fase è rappresentata dall'estrazione dell'RNA virale dal campione biologico (siero, biopsie fresche, congelate, fissate in formalina e incluse in paraffina).
- La seconda fase consiste nella retrotrascrizione in DNA e nell'amplificazione vera e propria, utilizzando primers biotinilati.
- La terza fase è costituita dalla rivelazione del prodotto di amplificazione biotinilato, mediante l'ibridazione con una sonda specifica.

L'alta sensibilità del test fa sì che la PCR qualitativa sia il metodo di scelta per la diagnosi iniziale di infezione da HCV e per il monitoraggio della risposta terapeutica. Inoltre può essere utilizzata anche nelle prime fasi dell'infezione, e come screening nel caso delle trasfusioni di sangue.

Ricerca quantitativa di HCV-RNA: Real-time PCR

La carica virale HCV-RNA è determinata dal numero di particelle virali di HCV circolanti nel sangue in un dato momento.

Possedere dati quantitativi di HCV-RNA permettono di definire l'entità e la durata della terapia farmacologica: nei pazienti che vanno incontro ad una risoluzione spontanea dell'infezione si ha un calo graduale e continuo di HCV-RNA, mentre i livelli restano inalterati in caso di cronicizzazione.

SEPSI

Una delle patologie più subdole che esistono da un punto di vista di complicazione clinica sono quelle che vanno sotto il nome di **sepsi**.

La "sepsi" (o setticemia) è una malattia sistemica risultante da una complessa interazione tra microrganismi infettanti e risposta infiammatoria, immunitaria e procoagulante dell'ospite.

Creano un sistema così tanto complesso che è difficile far fronte ai microrganismi attraverso un'unica terapia farmacologica.

Le sepsi vengono distinte in base all'intensità con cui si manifestano: sepsi lieve, grave e shock settico.

- ▶ La "sepsi grave" è definita come ipoperfusione o disfunzione di uno o più organi (ipotensione, ipossiemia, oliguria, acidosi metabolica, trombocitopenia, alterazioni del sensorio).
- ▶ Lo "shock settico" è definito da un'ipotensione arteriosa, refrattaria a riempimento volemico ed associata a disfunzione multiorganica.

Secondo dati recenti, la mortalità in terapia intensiva della sepsi grave è pari al 25-30% mentre dello shock settico è pari 40-70%.

La diagnosi di sepsi e l'identificazione della causa dell'infezione devono essere eseguiti più rapidamente possibile per permettere un tempestivo intervento terapeutico (antimicrobico ed eventualmente chirurgico) ed evitare la progressione della sepsi a sepsi grave e shock settico e ridurre quindi la mortalità per questo tipo di patologie.

La diagnosi inizialmente veniva effettuata attraverso un metodo colturale: veniva prelevato un campione di liquido biologico e messo in emocultura in terreni di crescita selettivi e antibiogramma.

La risposta a questi esami arrivava in 48-72h che per questo tipo di patologia è un lasso di tempo estremamente lungo: tempi di risposta di 48-72 ore o più (emocultura in terreni di crescita selettivi e antibiogramma) sono oggi considerati inaccettabili per la gestione della sepsi. Infatti, il rischio di morte aumenta del 9% ogni ora di ritardo nella somministrazione della terapia antibiotica adeguata (studi recenti hanno dimostrato che la terapia empirica, quando applicata, è adeguata solo nel 53.9% dei casi).

Attualmente la diagnosi di sepsi viene effettuata attraverso il sistema *SeptiFast* (Roche, USA). Questo sistema applica la tecnologia Real-time PCR alla diagnosi molecolare di sepsi, potendo rilevare i principali batteri Gram negativi, Gram positivi e miceti, responsabili di sepsi (più del 90% dei casi). Può rilevare il DNA (a partire da 3 copie genomiche) dell'agente eziologico responsabile di sepsi in meno di 6 ore, partendo da un campione di 3 ml di sangue intero.

Tale sistema utilizza la regione target "internal transgenic spacer" (ITS). Questa regione è presente in svariati operoni nel genoma di batteri e funghi ed è in grado di fornire una maggiore sensibilità analitica rispetto ai geni a copia singola. Inoltre, la regione ITS è più specie-specifica rispetto agli RNA ribosomiali e quindi più idonea alla differenziazione delle specie.

Le regioni ITS selezionate sono situate tra le sequenze 16S e 23S del DNA ribosomiale dei batteri Gram positivi e Gram negativi e tra le sequenze 18S e 5.8S del DNA ribosomiale dei funghi.

Il sistema prevede 3 fasi:

- La preparazione dei campioni (sangue in K-EDTA) e del controllo negativo viene fatta mediante lisi meccanica e purificazione del DNA;
- Amplificazione in real-time PCR del DNA purificato in tre reazioni parallele (batteri Gram positivi, batteri Gram negativi e miceti) e contemporanea rivelazione con sonde di ibridazione marcate con fluorofori specifici;
- Identificazione automatica delle specie e dei controlli interni mediante analisi della curva di melting che permette di differenziare le specie grazie alla temperatura di melting specifica (la Tm di ciascuna sequenza target è fortemente caratteristica e dipende dalla lunghezza, dalla sequenza e dal grado di omologia tra la sonda e il DNA target).

DIAGNOSTICA MOLECOLARE in PARASSITOLOGIA

Le tecniche di amplificazione e determinazione genica applicate alla Parassitologia si sono dimostrate un valido supporto alle tradizionali tecniche diagnostiche.

L'approccio classico nella diagnosi dell'eziologia specifica di una malattia infettiva si basa in genere su:

- 1) l'identificazione morfologica/fisiologica del patogeno isolato dall'organismo malato;
- 2) l'analisi sierologica volta all'identificazione degli anticorpi sviluppati dall'ospite.

In entrambi i casi esistono una serie di limiti al loro impiego, in particolare, l'esame microscopico diretto è spesso caratterizzato da scarsa sensibilità e specificità, mentre i metodi immunologici sono spesso alterati dalla mancanza di correlazione assoluta tra risposta anticorpale ed infezione attiva (infezione pregressa).

Per tali motivi la PCR si è dimostrata un valido supporto diagnostico per importanti parassitosi quali:

- Amebiasi

- Malaria
- Toxoplasmosi

AMEBIASI

L'infezione indotta da **Entamoeba histolytica** è conosciuta come amebosi intestinale ed è localizzata elettivamente a livello del cieco e dell'intestino crasso. Questa infezione intestinale può eventualmente complicarsi con forme pseudo-ascessuali, soprattutto a livello epatico.

I compartimenti sopra descritti individuano con precisione i materiali biologici di elezione da cui inizialmente partire per la ricerca di *Entamoeba* spp.: campioni di feci a fresco o fissate in formalina.

In natura esistono due specie morfologicamente identiche di *Entamoeba*, caratterizzate da differente patogenicità:

1. *Entamoeba histolytica*: patogena e causa di forme clinicamente manifeste;
2. *Entamoeba dispar*: non patogena, presente come semplice commensale intestinale.

La differente patogenicità rende necessaria una corretta tipizzazione biochimica e molecolare per identificare i ceppi patogeni e, solo in tal caso, giustificare l'intervento terapeutico.

Protocollo Diagnostico

1. Amplificazione mediante PCR (la regione target è rappresentata dal gene che codifica per rRNA 18S)
2. Rilevamento (Frammento di 420 bp per entrambi i ceppi di *Entamoeba*).
3. Digestione con l'enzima di restrizione Dde I (90' a 37°).
4. Rilevamento:
 - 3 bande (50, 130 e 240 bp) identificano *E. histolytica*;
 - 2 bande (130 e 290 bp) identificano *E. dispar*.

MALARIA

Nel caso della malaria l'introduzione della diagnosi molecolare ha reso possibile l'identificazione della specie di *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*) presente anche in caso di bassa parassitemia e coinfezioni.

La variabilità di sequenza intraspecie o "microeterogeneità" può essere molto utile per disegnare primer/sonde in grado sia di identificare che distinguere gli isolati patogeni. Proprio su questa variabilità si basa l'identificazione della specie, fondamentale per definire l'urgenza del trattamento farmacologico in pazienti con infezione da *P. falciparum*.

Il materiale d'elezione è il sangue periferico: all'interno del globulo rosso si può andare a distinguere più facilmente quello che è il malarico dal *falciparum*.

Protocollo Diagnostico

1. Amplificazione Genere-Specifica: unica coppia di primer disegnata su una regione target altamente conservata del gene che codifica per rRNA 18S.
I campioni positivi vengono sottoposti al successivo test di screening per identificare la specie di *Plasmodium* presente.
2. Amplificazione Specie-Specifica: 4 differenti coppie di primer disegnate sulla regione target per: *P. falciparum*; *P. malariae*; *P. ovale*; *P. vivax*

TOXOPLASMOSI

Si tratta di una zoonosi ubiquitaria (posso diffondersi tra varie specie animali) causata dal parassita *Toxoplasma gondii* che vive in genere nel tratto intestinale del gatto (ospite definitivo). Tuttavia è stato dimostrato che la coabitazione tra gatti e uomo non è un fattore di rischio importante per l'infezione di *Toxoplasma*, e che è molto più pericoloso cibarsi di carni crude o poco cotte (specie di agnello), di insaccati, di verdure lavate male o di latticini non pastorizzati.

L'infezione primaria nell'ospite immunocompetente è generalmente asintomatica e autolimitante, mentre nei feti e nei pazienti con immunocompromissione grave (HIV+, trapiantati) può avere un decorso molto più severo (nei feti si può avere morte intrauterina in seguito a danni neurologici).

I tessuti e fluidi biologici di partenza per l'analisi molecolare sono molteplici: sangue, liquido amniotico, placenta, umor acqueo, liquor cefalo rachidiano, biopsia cardiaca e cerebrale.

La diagnosi viene effettuata attraverso la nested PCR.

PROTOCOLLO DIAGNOSTICO:

- Estrazione acidi nucleici
- Amplificazione 1: amplificazione del gene B1 (prodotto PCR 239 bp)
- Amplificazione 2: lunghezza del prodotto PCR nested 132 bp.
- Elettroforesi su gel

Diagnosticare la toxoplasmosi diventa importante in caso di gravidanza: la componente parassitologica trasmessa da madre a figlio può causare aborto spontaneo o feto con malformazioni.

APPLICAZIONI DELLA PCR IN ONCOLOGIA: ONCOGENI & ONCOSOPPRESSORI

In oncologia le tecniche di PCR vengono utilizzate al fine di identificare oncogeni e oncosoppressori.

PROTO-ONCOGENI: geni normali che codificano per proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare/ differenziamento. Una mutazione puntiforme, un'amplificazione del gene o una traslocazione cromosomica può portare all'attivazione dell'oncogene. Le mutazioni su questo tipo di geni sono dominanti e perciò basta l'attivazione di uno solo dei due alleli per l'attività trasformante.

ONCOSOPPRESSORI: limitano la capacità replicativa della cellula e la sua crescita, inducendo pause nel ciclo cellulare in modo da riparare eventuali danni al materiale genetico oppure determinano l'apoptosi nelle cellule danneggiate. La perdita o la mutazione di tali geni (es. p53, BRCA 1 e 2, Rb) determina una crescita incontrollata della cellula stessa e l'ereditarietà di mutazioni nella progenie della cellula danneggiata.

ONCOLOGIA MOLECOLARE: DIAGNOSI PRECOCE

L'analisi delle alterazioni di oncogeni/oncosoppressori può risultare di aiuto per:

- 1) diagnosi: distinzione tra lesioni benigne, premaligne e maligne
- 2) prognosi: predizione di un comportamento di una neoplasia
- 3) screening: analisi di individui e famiglie per evidenziare la predisposizione allo sviluppo di particolari neoplasie.

La diagnostica molecolare in campo oncologico assume un'importanza fondamentale perché consente di individuare a livello precoce (pre-sintomatico) i soggetti in cui si sta sviluppando la patologia tumorale.

La diagnosi molecolare delle neoplasie mediante analisi del DNA viene condotta su campioni biologici quali: urine, feci, espettorato, tampone vaginale, sangue, ricercando ed identificando l'eventuale presenza di cellule portatrici di un'informazione genetica alterata.

La sensibilità è talmente elevata da essere molto attendibile anche in presenza nel campione in esame di poche cellule tumorali, livello non raggiungibile con i tradizionali "markers tumorali".

MUTAZIONI PUNTIFORMI K-RAS

Gli oncogeni appartenenti alla famiglia *ras* (*H-ras*, *K-ras* e *N-ras*) svolgono un ruolo importante nella trasduzione del segnale e nella proliferazione cellulare.

Le proteine RAS (p21^{RAS}) sono proteine G leganti il GDP/GTP e possono acquisire potere trasformante in seguito a

mutazioni puntiformi a livello dei codoni 12, 13 o 16 dei rispettivi geni.

Più del 30% degli adenocarcinomi presenta una mutazione dell'oncogene *K-ras* che, nella grande maggioranza dei casi, coinvolge il codone 12 del gene determinando una transversione G>T.

Il gene *K-ras* presenta mutazioni solo in sedi specifiche localizzate nelle prime due basi del codone 12 (GGT) che eliminano un sito di restrizione per un enzima specifico e possono essere facilmente dimostrate a livello molecolare mediante amplificazione e digestione con l'enzima di restrizione: in seguito a digestione l'allele wild type è 114/29/14 bp; l'allele mutato è 143/14 bp.

SIGNIFICATO CLINICO di K-RAS → Identificare mutazioni a carico di *k-ras* permettono di identificare la predisposizione (e quindi di effettuare una diagnosi precoce) per :

- Carcinoma del pancreas esocrino (65-100% casi)
- Carcinoma polmonare (30% dei casi)
- Carcinomi colon-rettali (80% dei casi): diagnosi precoce
- Circa il 50% dei carcinomi follicolari tiroidei è possibile riscontrare la mutazione in uno dei tre membri della famiglia *ras*.

MUTAZIONI PUNTIFORMI p53

La proteina p53 wild type è un regolatore del ciclo cellulare: la sua funzione è connessa con il sistema apoptotico delle cellule, perciò le cellule con una proteina p53 difettosa vanno incontro a proliferazione.

Questa proteina è codificata da un gene oncosoppressore localizzato sul cromosoma 17: questo gene risulta essere mutato in più del 55% di tutti i tumori maligni umani (non può essere utilizzata per diagnosticare una neoplasia), mentre nei carcinomi colon-rettali la presenza di p53 mutata correla con la tendenza a formare metastasi.

Circa il 90% delle mutazioni rilevate in diverse neoplasie sono localizzate negli esoni 5, 6, 7 e 8. In ogni caso tutte le mutazioni possono essere dimostrate mediante tecniche di amplificazione del DNA e successiva analisi SSCP

SSCP (polimorfismo elettroforetico di DNA a singola elica): Tale tecnica si basa sul fatto che le sequenze di DNA a catena singola si piegano in conformazioni secondarie specifiche, in modo tale che le sequenze di DNA wild type e mutante possano essere separate mediante elettroforesi su gel di acrilamide (la presenza di una mutazione altera la struttura 3D e quindi la mobilità del frammento).

Quanto più aumentano le dimensioni di un frammento di DNA tanto più diventa difficile evidenziare le differenze di mobilità (efficienza dell'80% per frammenti minori di 200 bp e del 60-70% per frammenti di 300-400 bp)

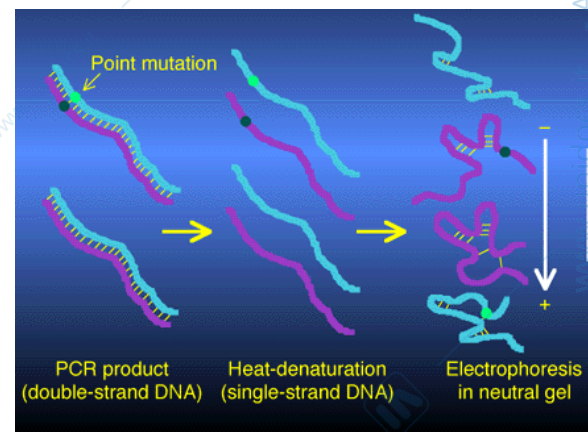
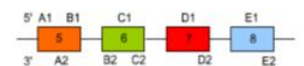
Il DNA a doppia elica amplificato mediante PCR viene denaturato e caricato sul gel di poliacrilammide per la rivelazione (colorazione argentea) di mutazione puntiformi a carico del gene p53 nei tessuti neoplastici. In caso di mutazione non si avrà il riarrangiamento e quindi migreranno in maniera diversa.

TRASLOCAZIONE 14; 18: BCL-2

Oltre a mutazioni puntiformi, le traslocazioni possono essere causa di sviluppo di neoplasie.

REGIONI AMPLIFICATE:

Esone 5 (A1-A2): 152 bp Esone 5-6 (B1-B2): 167 bp
Esone 6 (C1-C2): 132 bp Esone 7 (D1-D2): 136 bp
Esone 8 (E1-E2): 149 bp



Il gene *bcl-2*, generalmente espresso dalle cellule linfoidi allo stadio pre-B, svolge un ruolo importante nello sviluppo cellulare: promuove l'apoptosi quando la cellula B immatura non esprime il recettore funzionale delle immunoglobuline o esprime i recettori per gli antigeni self e previene l'apoptosi durante lo sviluppo normale.

Oltre l'80% dei Linfomi Follicolari è caratterizzato dalla presenza della traslocazione cromosomica t(14;18) nella quale il proto-oncogene *bcl-2*, che in condizioni normali è situato a livello del cromosoma 18, viene a trovarsi sotto il controllo del gene delle catene pesanti delle immunoglobuline (*IgH*), situato nel cromosoma 14, creando in tal modo un gene chimerico denominato *bcl-2/IgH*. In questa condizione *bcl-2* viene deregolato e ipertrascritto, aumenta la sintesi della proteina Bcl 2 con blocco

Almeno il 70% delle rotture del gene *bcl-2* avviene all'interno della Major Breakpoint Region (MBR), a livello del terzo esone; i rimanenti punti di rottura sono localizzati a livello della Minor Cluster Region (MCR),

Il protocollo di amplificazione prevede:

- Estrazione di DNA a partire da sangue periferico o midollare, tessuto fresco, congelato o fissato in formalina e incluso in paraffina
- Amplificazione della regione MBR e MCR (600pb)
- Amplificazione PCR nested (120-350 bp)
- Elettroforesi su gel d'agarosio

ONCOLOGIA MOLECOLARE: TEST PREDITTIVI

La maggior parte dei tumori sono sporadici, solo una piccola percentuale è ereditaria. Si stima che circa il 7% dei tumori alla mammella, il 10% dei tumori ovarici, il 5-10 % dei tumori coloretali, e il 20% dei tumori midollari della tiroide abbiano una componente familiare.

In questi tumori le mutazioni del DNA insorgono a livello delle cellule germinali e potranno essere trasmesse alla progenie (*ereditarietà della predisposizione*)

Questi test sono rivolti a quelle persone che ad una approfondita anamnesi familiare risultano con elevata e specifica incidenza di malattie neoplastiche nelle generazioni precedenti, e pertanto ad elevato rischio di essere portatori di mutazione germinale. Inoltre permette di attuare un programma di screening riservato ai soggetti ad alto rischio, in modo tale da facilitare la diagnosi precoce all'insorgenza del tumore.

TEST DI PREDISPOSIZIONE GENETICA ALLO SVILUPPO DEL CARCINOMA COLORETTALE EREDITARIO:

L'analisi di mutazione dei geni MSH2 ed MLH1 viene condotta al fine di valutare la predisposizione genetica del paziente allo sviluppo del tumore al colon (*Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer - HNPCC*).

L'HNPCC, conosciuta anche come *Sindrome di Lynch*, è una malattia tumorale autosomica dominante caratterizzata da due manifestazioni fenotipiche:

- sindrome di Lynch I, che è caratterizzata dall'insorgenza di una neoplasia al colon ad un'età media di circa 45 anni.
- sindrome di Lynch II, che oltre al tumore al colon comprende lo sviluppo di neoplasie extracoloniche, a livello dell'endometrio, dell'ovaio, dello stomaco, del tratto urinario, dei dotti biliari.

Circa il 90% delle mutazioni avvengono a livello dei geni MSH2 e MLH1 (60% in MSH2 e 30% in MLH1), coinvolti nel controllo e nella riparazione degli errori di replicazione del DNA.

Quando avviene un evento mutazionale a livello di uno di questi geni, la capacità di effettuare la riparazione degli errori intersorsi durante la duplicazione del DNA diminuisce, e di conseguenza le mutazioni iniziano ad accumularsi nella cellula, conducendo allo sviluppo neoplastico.

Il gene MSH2 è localizzato sul cromosoma 2, comprende 16 esoni ed ha una dimensione di circa 73 kb.

Il gene MLH1, invece, è localizzato sul cromosoma 3, è costituito da 19 esoni, ed ha una dimensione di circa 58 kb.

TEST DI PREDISPOSIZIONE ALLO SVILUPPO DEL CARCINOMA MAMMARIO ED OVARICO

L'analisi di mutazione dei geni BRCA1 e BRCA2 viene condotta al fine di valutare la predisposizione genetica del paziente allo sviluppo dei tumori alla mammella ed all'ovaio. Si stima che circa il 14% dei tumori alla mammella ed il 10% dei tumori ovarici siano causati da mutazioni ricorrenti a livello del gene BRCA1 e BRCA2.

I tumori ereditari alla mammella ed all'ovaio sono causati da mutazioni ricorrenti a livello della linea germinale che possono essere trasmessi da entrambi i genitori, sia ai figli maschi che femmine, in maniera autosomica dominante, cioè i figli hanno il 50% di probabilità di ereditare la suscettibilità genetica allo sviluppo dei citati tumori.

BRCA1 e BRCA2 sono geni onco-soppressori localizzati rispettivamente sul cromosoma 17 e sul cromosoma 13. Il gene BRCA1 comprende 24 esoni ed ha una dimensione di circa 5,6 Kb, mentre il gene BRCA2 comprende 27 esoni ed ha una dimensione di circa 10 kb.

Nelle persone predisposte geneticamente, la perdita della funzione del gene onco-soppressore è dovuta a mutazioni con conseguente produzione di una proteina anormale.

ANALISI DI MUTAZIONE: GENI MSH2 E MLH1 e GENI BRCA1 E BRCA2

L'analisi di mutazione del DNA viene condotta mediante PCR, amplificando sia la regione codificante completa dei geni che parte della regione intronica per ciascun esone del gene. Successivamente i prodotti di PCR ottenuti vengono sequenziati mediante l'impiego di un sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente. La sequenza di ciascun esone viene confermata mediante il sequenziamento del filamento opposto, e successivamente viene condotta l'analisi comparativa delle due sequenze con una sequenza di riferimento priva di mutazioni (sequenza wilde type) per accertare l'eventuale presenza di mutazione.

APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE DELLA PCR IN GENETICA UMANA

Per i suoi vantaggi di accuratezza e sensibilità, la PCR è ormai il metodo diagnostico di scelta in diverse malattie ereditarie, fra cui spiccano per importanza le talassemie, la distrofia muscolare, la fibrosi cistica, la fenilchetonuria, le emofilie, le delezioni del cromosoma Y nell'infertilità maschile.

Finora l'analisi del DNA per la diagnosi delle malattie genetiche è stata applicata più frequentemente in fase prenatale, di solito eseguita col fine di indurre l'interruzione di gravidanza. L'individuazione della malattia è più probabile quando i due genitori abbiano già avuto un figlio affetto o siano stati identificati come portatori, oppure uno o entrambi siano affetti da una condizione di tipo dominante.

L'analisi del DNA può essere eseguita senza bisogno di raccogliere campioni biotipici di tessuto fetale. Nelle prime diagnosi prenatali si usavano cellule del liquido amniotico prelevate mediante amniocentesi intorno alla 16°-18° settimana di gestazione. Più di recente è stata introdotta la raccolta di campioni di villi coriali (piccole formazioni arborescenti che, nel loro insieme, costituiscono la placenta) eseguibile tra l'8° e la 10° settimana di gestazione.

FIBROSI CISTICA

È la malattia autosomica recessiva grave più comune nella popolazione italiana. (incidenza compresa tra 1/2.730 e 1/3.170). Da questi dati si può dedurre una frequenza di portatori compresa tra 1/26 e 1/30.

Le manifestazioni cliniche della malattia sono determinate dalla presenza di secrezioni esocrine mucose dense, che portano a malattia polmonare cronica ostruttiva ad evoluzione verso l'insufficienza respiratoria. Si possono avere anche altre manifestazioni cliniche di rilievo, tra cui insufficienza pancreatica esocrina, epatopatia, diabete, e nella quasi totalità dei maschi affetti, azoospermia.

Il *gold standard* per la diagnosi di malattia è il test del sudore (con cloro e sodio in concentrazioni superiori alla norma). Se il test non è eseguibile o risolutivo, può essere indicata un'analisi genetica.

Il gene responsabile della malattia si trova sul braccio lungo del cromosoma 7, contiene 250.000 bp e codifica per una proteina di 1480 AA detta CFTR (regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica) la cui funzione principale riguarda il trasporto transmembrana del cloro.

Struttura della proteina CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator): la proteina CFTR regola la quantità di cloro che viene secreto insieme ai liquidi biologici. Nei pazienti affetti da FC il gene della CFTR possiede da mutazioni puntiformi (proteina non prodotta o non funzionale). A causa del deficit della proteina, le secrezioni contengono una scarsa quantità di acqua e di sali, e sono molto più dense e viscosi del normale.

La mutazione più frequente (F508del) provoca la rimozione della fenilalanina in posizione 508 della proteina CFTR. In Italia F508del è la mutazione più frequente (51%).

La fibrosi cistica può essere diagnosticata grazie a molti metodi diversi, tra cui lo screening neonatale, il test del sudore e test genetici (tecniche di analisi molecolare di 1 e 2 livello)

TECNICHE di ANALISI MOLECOLARE ANALISI di 1° LIVELLO

L'analisi genetica di primo livello consiste nella ricerca delle mutazioni più frequenti nella popolazione. Possono essere utilizzate tecniche "home made" o kit commerciali. Le tecniche artigianali sono abitualmente poco costose, ma non perfettamente riproducibili; viceversa, i kit commerciali consentono di risparmiare sui tempi degli operatori, sono ben riproducibili e permettono di analizzare un pannello di mutazioni uniforme nei diversi laboratori. In Italia, utilizzando i kit commerciali che includono una trentina di mutazioni si ha un *detection rate* del 75% circa.

AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEMS (ARMS): Il sistema di amplificazione delle mutazione refrattarie prevede una reazione polimerasica a catena in cui uno dei due *primer* è costruito in modo che il nucleotide in posizione 3' sia complementare alla sequenza mutata del gene o a quella normale.

Il DNA genomico non viene amplificato quando si usa il *primer* non perfettamente complementare alla sequenza in esame. Visualizzazione dei prodotti amplificati con l'elettroforesi su gel di agarosio.

TECNICHE di ANALISI MOLECOLARE ANALISI di 2° LIVELLO

L'analisi genetica di secondo livello utilizza sistemi di "scanning" del gene che permettono il riconoscimento di variazioni di sequenza in definite porzioni codificanti e nelle regioni di splicing del gene CFTR.

DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE):

Tecnica elettroforetica per la separazione di frammenti di DNA in base alle loro differenti proprietà di dissociazione o "melting". Il DNA amplificato, wild type e mutante, è frazionato attraverso un gradiente chimico denaturante. Quando i due filamenti iniziano a dissociarsi si ha una riduzione della velocità di migrazione rispetto alla molecola di DNAs. La presenza di mutazioni, modifica la proprietà di melting del DNA amplificato rispetto a quello wild type. Questi due tipi di molecole si dissocieranno quindi in punti diversi del gradiente denaturante e saranno distinguibili in base alla diversa migrazione elettroforetica, se caricati l'uno accanto all'altro su gel DGGE. Questo tipo di analisi non necessita di radioattività e, inoltre, la combinazione di un'analisi di primo livello e un'analisi di secondo livello utilizzando la tecnica del DGGE fornisce una *detection rate* di circa 85%.

DENATURING HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY (DHPLC): è un'evoluzione in automatico del DGGE e permette l'identificazione di varianti nucleotidiche in brevissimo tempo. Consiste in una cromatografia liquida a scambio ionico in fase inversa: in condizioni parzialmente denaturanti e a temperatura controllata, permette di discriminare molecole di DNA eteroduplex rispetto alle molecole omoduplex all'interno di prodotti eterogenei di PCR.

I duplex si formano quando frammenti amplificati di DNA vengono denaturati termicamente e lasciati ricombinare. Una qualsiasi variazione (mutazione o polimorfismo) tra le due forme alleliche di un frammento porta alla

formazione di un eteroduplex (combinazione di due catene di DNA a singola catena, non perfettamente corrispondenti, caratterizzata dalla presenza di una "bolla" a livello della quale si trova il mismatch).

L'eteroduplex si comporta cromatograficamente in modo differente sia dall'omoduplex non mutato che dall'omoduplex mutato: l'eteroduplex è solitamente più veloce (meno trattenuto) degli omoduplex e da ciò si può caratterizzare la presenza di una variazione nucleotidica in un campione. La presenza di una mutazione o di un polimorfismo si evidenzia quindi, mediante picchi ulteriori o con un profilo diverso rispetto al "wild type".

Per monitorare le separazioni ottenute in colonna si utilizza uno spettrofotometro dotato di microcella a flusso, dove l'eluato passa in continuo e ne viene effettuata la lettura nell'ultravioletto a 260 nm. Il risultato viene registrato dal PC e riportato sotto forma grafica di cromatogramma.

La sensibilità della DHPLC per le mutazioni puntiformi è del 95-97% e può essere applicata su frammenti di DNA di dimensioni tra 100 e 700 bp.

Il grande vantaggio è che pur non caratterizzando la mutazione, la DHPLC è in grado di rivelarne la presenza all'interno del frammento analizzato. L'eventuale mutazione o polimorfismo verrà poi caratterizzato mediante analisi di sequenza.

SEQUENZIAMENTO DIRETTO DEL DNA

La marcatura attualmente più utilizzata per l'analisi di sequenza è quella che si avvale di terminatori di catena denominati *big dye terminator* che consistono nei quattro didesossinucleotidi marcati con molecole fluorescenti.

I prodotti della reazione di marcatura vengono sottoposti a elettroforesi su sequenziatore, man mano che i frammenti di DNA di diversa lunghezza raggiungono la posizione del *detector*, vengono rilevati e identificati grazie all'emissione di luce alle lunghezze d'onda specifiche dei diversi fluorocromi, eccitati dal laser dello strumento.

Le emissioni vengono raccolte e analizzate da una fotocamera digitale CCD (Coupled Charge Device) che riporta la sequenza delle emissioni in un grafico chiamato elettroferogramma, caratterizzato da una successione di picchi di 4 colori differenti che corrispondono alle emissioni fluorescenti dei diversi fluorocromi.

INFERTILITA' MASCHILE

Fino ad ora si è parlato di infertilità di coppia che per antonomasia era responsabilità della donna non poter portare ad una gravidanza. In realtà buona parte è causa di mutazioni indotte o acquisite a carico del del cromosoma Y dell'uomo.

Il cromosoma Y ha un ruolo importante nella spermatogenesi: è stata localizzata sul braccio lungo del cromosoma Y una regione che controlla la spermatogenesi nell'uomo e che codifica per lo *human azoospermia factor (AZF)*. Individui con difetti nella spermatogenesi o con azoospermia presentano delezioni in corrispondenza della regione AZF. Alterazioni a carico di uno o più loci AZF (AZFa, AZFb e AZFc) comportano la drastica riduzione delle cellule germinali fino alla loro completa assenza.

Il test per la ricerca delle Microdelezioni del Cromosoma Y consente di valutare se eventi di delezione hanno eliminato sequenze normalmente presenti sul cromosoma Y e coinvolte nella regolazione della spermatogenesi nell'uomo. Consiste nell'amplificazione multipla mediante PCR di 24 regioni del cromosoma Y conosciute come STS (*Sequence Tagged Sites*), distribuite lungo i i loci AZFa, AZFb, ed AZFc, ed è in grado di identificare quei soggetti in cui è presente una microdelezione di uno o più geni implicati nella spermatogenesi e quindi responsabile della infertilità maschile.

La co-amplificazione del gene Y-specifico SRY (braccio corto Y) funge da controllo interno di reazione al fine di verificare la buona qualità del DNA su cui si effettua l'analisi (sangue periferico)